

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

Ref. 4E

(11)Publication number : 10-088124

(43)Date of publication of application : 07.04.1998

(51)Int.Cl.

C09K 11/06
G01N 33/533

(21)Application number : 09-115920

(71)Applicant : PERKIN ELMER CORP:THE

(22)Date of filing : 06.05.1997

(72)Inventor : LEE LINDA G
SPURGEON SANDRA L
ROSENBLUM BARNETT

(30)Priority

Priority number : 96 642330
96 726462

Priority date : 03.05.1996
04.10.1996

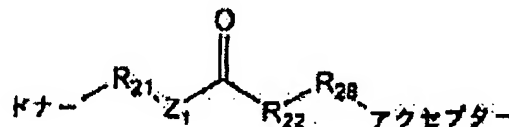
Priority country : US
US

(54) ENERGY TRANSFER PIGMENT HAVING ENHANCED FLUORESCENCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject pigment represented by a specific formula and useful as a linker for increasing the effective transfer of energy between a donor pigment and an acceptor pigment in an energy transfer pigment.

SOLUTION: This pigment is represented by the formula [the donor is a pigment capable of absorbing light having the first wavelength and responding to release excitation energy; the acceptor is a pigment capable of absorbing excitation energy released from the donor pigment and emitting fluorescence having the second wavelength; C(O) is carbonyl; Z1 is NH, S, O; R21 is a 1-5C alkyl bound to the donor pigment; R22 is an alkene, a diene, an alkyne, etc.; R28 is a functional group bound to the acceptor pigment].



* NOTICE *

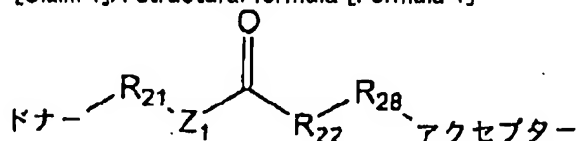
JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

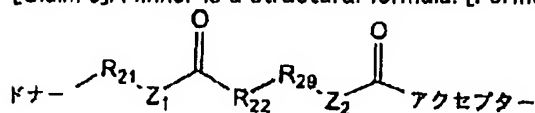
[Claim 1] A structural formula [Formula 1]



(Among a formula, a donor is coloring matter which absorbs the light of the first wave, can answer and can release excitation energy, and) An acceptor absorbs the excitation energy released with donor coloring matter, It is coloring matter which can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and C (O) is a carbonyl group, Z₁ is chosen from the group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R₂₁ is the C₁₋₅ alkyl combined with donor coloring matter, R₂₂ is the substituent chosen from the group which consists of condensed ring structure combined with the five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, and the functional group to which R₂₈ combines a linker with an acceptor pigment — containing — the energy transfer coloring matter which it has.

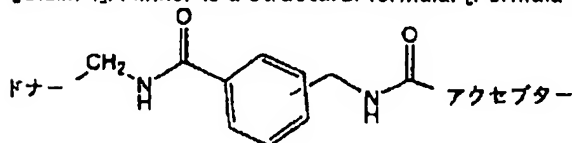
[Claim 2] R₂₂ Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, Cyclohexadiene, a franc, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, Isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, The energy transfer coloring matter according to claim 1 which is a five-membered ring or six membered-rings which were chosen from a group which consists of pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene.

[Claim 3] A linker is a structural formula. [Formula 2]



The energy transfer coloring matter according to claim 1 which has (inside of formula and Z₂ is chosen from the group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R₂₉ is C₁₋₅ alkyl).

[Claim 4] A linker is a structural formula. [Formula 3]



The energy transfer coloring matter according to claim 1 which ****.

[Claim 5] The energy transfer coloring matter according to claim 1 whose donor coloring matter is a member of a xanthene class of coloring matter.

[Claim 6] The energy transfer coloring matter according to claim 5 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 7] The energy transfer coloring matter according to claim 1 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which donor coloring matter becomes from fluorescein dye, rhodamine coloring matter, and an unsymmetrical benzo xanthene pigment.

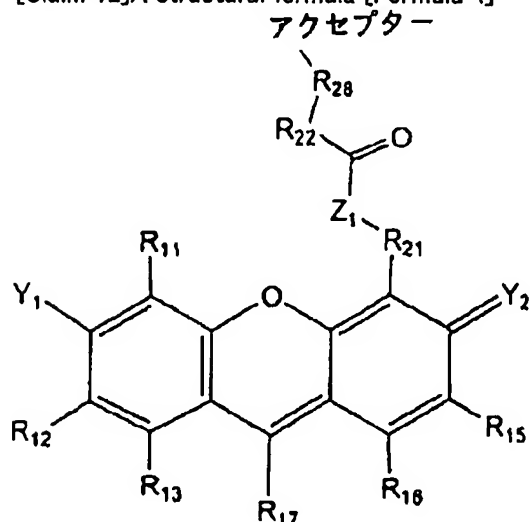
[Claim 8] The energy transfer coloring matter according to claim 7 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 9] Donor coloring matter Carboxyfluorescein, 4, 7-dichlorofluorescein coloring matter, The energy transfer coloring matter according to claim 1 chosen from a group which consists of an unsymmetrical benzo xanthene pigment, a rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, and the carboxy R6G.

[Claim 10] An acceptor pigment 4,7-dichlorofluorescein coloring matter, an unsymmetrical benzo xanthene pigment, A rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, The energy transfer coloring matter according to claim 1 chosen from a group which consists of a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, the carboxy R6G, a carboxy-X-rhodamine, and Cy5.

[Claim 11] The energy transfer coloring matter according to claim 1 in which an acceptor pigment is chosen from a group which consists of DR110-2, DR6G-2, DTMR, and DROX.

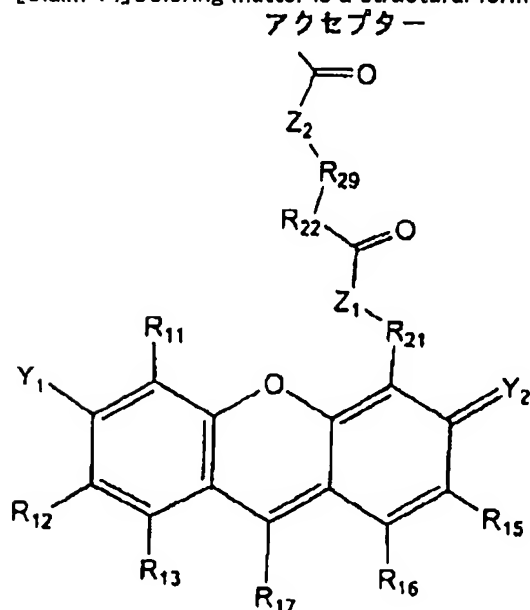
[Claim 12] A structural formula [Formula 4]



C (O) is a carbonyl group among a formula -- Y₁ and Y₂ -- respectively -- independent -- hydroxyl. It is chosen out of the group which consists of oxygen, iminium, and amine, and Z₁ NH. It is chosen out of the group which consists of sulfur and oxygen, and independently R₁₁ - R₁₇, respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, When alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring, And it is chosen out of the group which consists of such combination, and R₂₁ is C₁₋₅ alkyl, R₂₂ is the substituent chosen from the group which consists of condensed ring structure combined with the five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, the coloring matter which can absorb the excitation energy with which the acceptor was emitted by the member of the xanthene class of coloring matter including the functional group to which R₂₈ combines a linker with an acceptor pigment -- it is -- the energy transfer coloring matter which it has.

[Claim 13] R₂₂ Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, Cyclohexadiene, a franc, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, Isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, The energy transfer coloring matter according to claim 12 which is a five-membered ring or six membered-rings which were chosen from a group which consists of pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene.

[Claim 14] Coloring matter is a structural formula. [Formula 5]

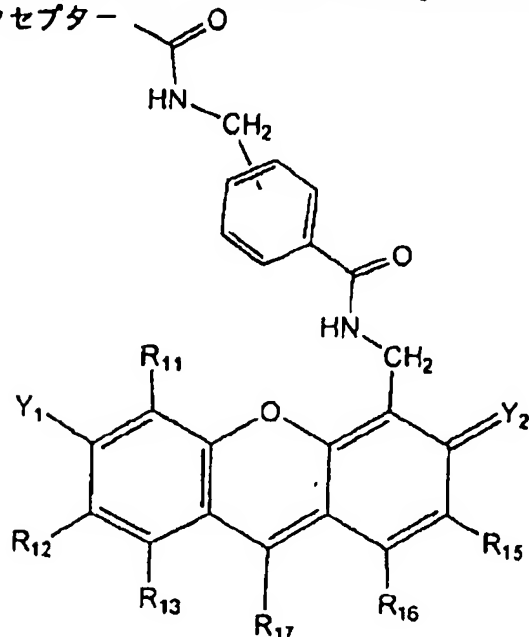


The energy transfer coloring matter according to claim 12 which has (inside of formula and Z₂ is chosen from the

group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R₂₉ is C₁₋₅ alkyl).

[Claim 15] A linker is a structural formula. [Formula 6]

アクセプター



The energy transfer coloring matter according to claim 12 which ****.

[Claim 16] The energy transfer coloring matter according to claim 12 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 17] The energy transfer coloring matter according to claim 12 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which donor coloring matter becomes from fluorescein dye, rhodamine coloring matter, and an unsymmetrical benzo xanthene pigment.

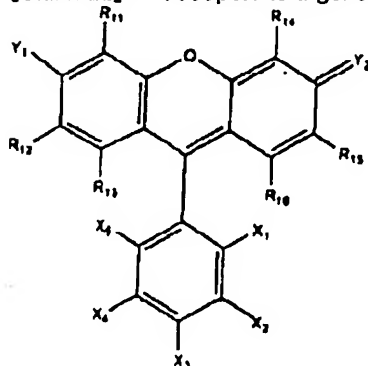
[Claim 18] The energy transfer coloring matter according to claim 17 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 19] Donor coloring matter Carboxyfluorescein, 4, 7-dichlorofluorescein coloring matter, The energy transfer coloring matter according to claim 12 chosen from a group which consists of an unsymmetrical benzo xanthene pigment, a rhodamine, a carboxy rhodamine, a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, and the carboxy R6G.

[Claim 20] The energy transfer coloring matter according to claim 19 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 21] An acceptor pigment 4,7-dichlorofluorescein coloring matter, an unsymmetrical benzo xanthene pigment, A rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, The energy transfer coloring matter according to claim 12 chosen from a group which consists of a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, the carboxy R6G, a carboxy-X-rhodamine, and Cy5.

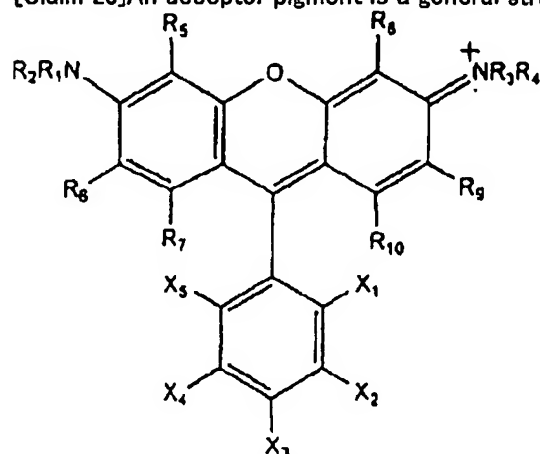
[Claim 22] An acceptor is a general structural formula. [Formula 7]



(Among a formula, Y₁ and Y₂ are chosen from the group which consists of hydroxyl, oxygen, iminium, and amine independently, respectively, and) Independently R₁₁ - R₁₆, respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, Carboxyl, alkyl, alkene, alkyne, sulfonate, and amino **. Ammonium, amide, nitril, alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, It is chosen out of the group which consists of such combination, when a contiguity substituent is mixed and

forms a ring, Independently $X_1 - X_5$, respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, Carboxyl, alkyl, alkene, alkyne, sulfonate, and amino **. when ammonium, amide, nitril, and an alkoxy ** contiguity substituent are mixed and form a ring, it is chosen out of the group which consists of such combination, and one of X_3 and the X_4 is combined with an R_{28} group -- **** -- the energy transfer coloring matter according to claim 12 which it has.

[Claim 23]An acceptor pigment is a general structural formula. [Formula 8]



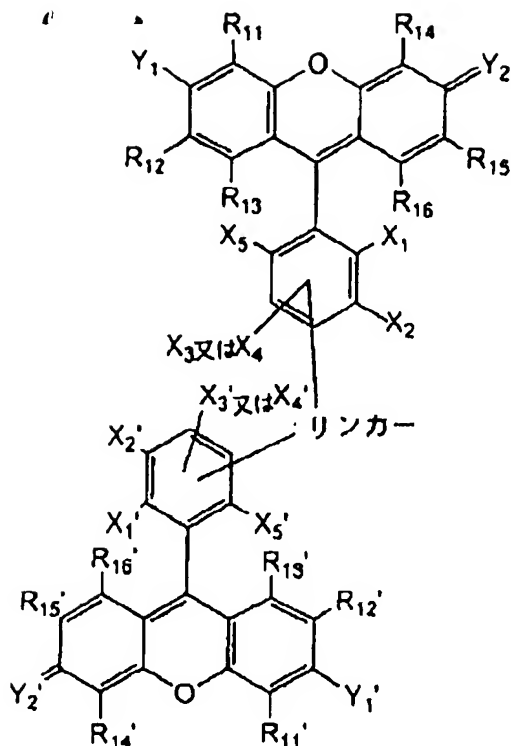
(Among a formula, $R_1 - R_4$ are chosen from the group which consists of hydrogen and alkyl independently, respectively, and) Or R_1 , R_5 and R_2 , R_6 and R_3 , and R_8 . It is made together [the basis of R_4 and R_9] by one or more, form a ring, and independently $R_5 - R_{10}$, respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, a sulfone, amino ** ammonium, amide, It is chosen out of the group which consists of nitril, alkoxy ** phenyl, and substituted phenyl, Or it is made together [$R_5 - R_{10}$] by two or more, and one or more rings are formed, Independently X_1 , X_3 , and X_4 , respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, Bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, it is chosen out of a sulfone, amino ** ammonium, amide, nitril, or the group, alkoxy ** and others, and X_2 and X_5 are chlorine, and one of X_3 and the X_4 is combined with R_{28} -- **** -- the energy transfer coloring matter according to claim 12 which it has.

[Claim 24]The energy transfer coloring matter according to claim 23 whose ring formed of substituent $R_5 - R_{10}$ is a five-membered ring, six membered-rings, or seven membered-rings.

[Claim 25]The energy transfer coloring matter according to claim 23 which is made together [a basis of R_1 , R_5 and R_2 , R_6 and R_3 , R_8 and R_4 , and R_9] by one or more, and forms a five-membered ring, six membered-rings, or seven membered-rings.

[Claim 26]The energy transfer coloring matter according to claim 23 chosen so that $R_1 - R_{10}$, X_1 , X_3 , and X_4 may be equivalent to coloring matter chosen from a group which consists of DR110-2, DR6G-2, DTMR-2, and DROX-2.

[Claim 27]A general structural formula [Formula 9]



a formula -- inside -- Y -- one -- Y -- one -- Y -- two -- and -- Y -- two --
 respectively -- independent -- hydroxyl. It is chosen out of the group which consists of oxygen, iminium, and amine,
 and independently R_{11} – R_{16} and R_{11}' – R_{16}' , respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl,
 an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, When alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a
 contiguity substituent are mixed and form a ring, It is chosen out of the group which consists of such combination,
 and independently X_1 – X_5 and X_1' – X_5' , respectively And hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl,
 an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, It is chosen out of the group which consists of
 such combination, when an alkoxy ** contiguity substituent is mixed and forms a ring, Are chosen so that it may be
 equivalent to the donor coloring matter which Y_1 , Y_2 , R_{11} – R_{16} and X_1 – X_5 absorb the light of the first wave, and
 can answer and can release excitation energy, and Y_1' , Y_2' , R_{11}' – R_{16}' and X_1' – X_5' the excitation energy released
 with donor coloring matter, [absorb and] It is chosen so that it may be equivalent to the acceptor pigment which
 can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and -- X -- three -- and -- X -- four --
 -- one -- a ** -- and -- X -- three -- ' -- and -- X -- four -- ' -- one -- a ** -- together --
 carrying out -- having -- energy -- a donor -- from -- an acceptor pigment -- transferring -- having -- as -- a
 donor -- an acceptor pigment -- joining together -- a linker -- forming -- the energy transfer fluorochrome which
 it has.

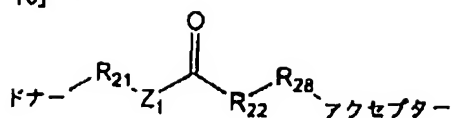
[Claim 28]The energy transfer coloring matter according to claim 27 which has a main chain (this is less than nine
 atoms in length) with which a linker combines a donor with an acceptor.

[Claim 29]A linker is general formula $R_{25}Z_3C(O)$ (among a formula, by a X_3 or X_4 substituent, R_{25} is the C_{1-4} alkyl
 combined with donor coloring matter, and), Z_3 is NH, O, or S, and C(O) is a carbonyl group -- and an end carbonyl
 group -- X_3' or X_4' -- it is combined with an acceptor pigment by a substituent -- **** -- the energy transfer
 coloring matter according to claim 27 which it has.

[Claim 30]A linker is general formula $R_{25}Z_3C(O)$ (among a formula). $R_{26}Z_4C(O)$ R_{25} is the C_{1-4} alkyl combined with
 donor coloring matter by a X_3 or X_4 substituent, R_{26} is C_{1-4} alkyl and independently Z_3 and Z_4 , respectively NH, it
 is O or S and C(O) is a carbonyl group -- and an end carbonyl group -- X_3' or X_4' -- it is combined with an
 acceptor pigment by a substituent -- **** -- the energy transfer coloring matter according to claim 27 which it
 has.

[Claim 31]5 or 6 carboxy TMR-B-CF, 5, or 6 carboxy TMR-F-CF, 5 or 6 carboxy TMR-P-CF, 5, or 6 carboxy TMR-
 P-CF, 5 or 6 carboxy TMR-A-CF, 5, or 6 carboxy TMR-D-CF, 5 or 6 carboxy TMR-N-CF, 5, or 6 carboxy ROX-CF,
 CY5-CF, 5 or 6 carboxy TMR-gly-5AMF and 5, or 6 carboxy TMR-5AMF, An energy transfer fluorochrome chosen
 from a group which consists of 5 or 6 carboxy CF-B-TMR-2, 5 or 6 carboxy CFB-DR 110-2, 5 or 6 carboxy CFB-
 DR6g-2 and 5, or 6 carboxy CFB-DROX-2.

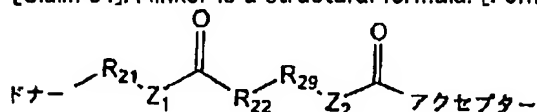
[Claim 32]A nucleoside embellished so that it might be combined with an energy transfer fluorochrome, A reagent
 chosen from a group which consists of nucleoside monophosphate, nucleoside diphosphate, nucleoside triphosphate,
 an oligonucleotide, and an oligonucleotide analog, It is the reagent containing an energy transfer fluorochrome
 combined with a reagent labeled fluorescently, and an energy transfer fluorochrome is a structural formula. [Formula



(Among a formula, a donor is coloring matter which absorbs light of the first wave, can answer and can release excitation energy, and) An acceptor absorbs excitation energy released with donor coloring matter. It is coloring matter which can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and C (O) is a carbonyl group, Z₁ is chosen from a group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R₂₁ is the C₁₋₅ alkyl combined with donor coloring matter, R₂₂ is the substituent chosen from a group which consists of condensed ring structure combined with a five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, and a functional group to which R₂₈ combines a linker with an acceptor pigment — containing — a reagent containing coloring matter which it has labeled fluorescently.

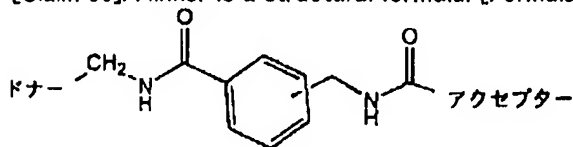
[Claim 33] R₂₂ Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, Cyclohexadiene, a franc, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, Isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, The reagent according to claim 32 which are a five-membered ring or six membered-rings which were chosen from a group which consists of pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene and which was labeled fluorescently.

[Claim 34] A linker is a structural formula. [Formula 11]



The reagent according to claim 32 which has (inside of formula and Z₂ is chosen from the group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R₂₉ is C₁₋₅ alkyl) and which was labeled fluorescently.

[Claim 35] A linker is a structural formula. [Formula 12]



The reagent according to claim 32 which **** and which was labeled fluorescently.

[Claim 36] The reagent according to claim 32 whose donor coloring matter is a member of a xanthene class of coloring matter and which was labeled fluorescently.

[Claim 37] The reagent according to claim 36 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter and which was labeled fluorescently.

[Claim 38] The reagent according to claim 32 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which donor coloring matter becomes from fluorescein dye, rhodamine coloring matter, and an unsymmetrical benzo xanthene pigment and which was labeled fluorescently.

[Claim 39] Donor coloring matter Carboxyfluorescein, 4, 7-dichlorofluorescein coloring matter, The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which consists of an unsymmetrical benzo xanthene pigment, a rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, and the carboxy R6G and which was labeled fluorescently.

[Claim 40] An acceptor pigment 4,7-dichlorofluorescein coloring matter, an unsymmetrical benzo xanthene pigment, A rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which consists of a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, the carboxy R6G, a carboxy-X-rhodamine, and Cy5 and which was labeled fluorescently.

[Claim 41] The reagent according to claim 32 with which an acceptor pigment is chosen from a group which consists of DR110-2, DR6G-2, DTMR, and DROX and which was labeled fluorescently.

[Claim 42] The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which a reagent becomes from a guanine deoxyriboside, guanine deoxyriboside monophosphate, guanine deoxyriboside diphosphate, and guanine deoxyriboside triphosphate and which was labeled fluorescently.

[Claim 43] The reagent according to claim 42 which is chosen from a group which a deoxy nucleotide becomes from deoxy cytosine, a deoxyadenosine, deoxyguanosine, and a deoxythymidine and which was labeled fluorescently.

[Claim 44] The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which a reagent becomes from a dideoxy nucleoside, dideoxy nucleoside monophosphate, dideoxy nucleoside diphosphate, and dideoxy nucleoside triphosphate and which was labeled fluorescently.

[Claim 45] The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which a dideoxy nucleotide becomes from deoxy cytosine, a deoxyadenosine, deoxyguanosine, and a deoxythymidine and which was labeled fluorescently.

[Claim 46] The reagent according to claim 42 whose reagent is an oligonucleotide and which was labeled

fluorescently.

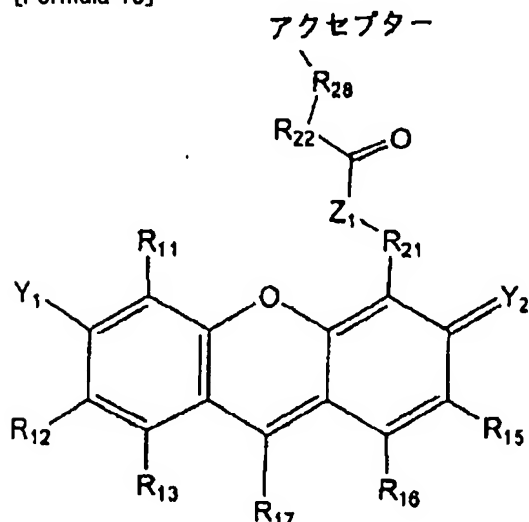
[Claim 47]The reagent according to claim 46 which has a three-dash terminal extensible when an oligonucleotide uses polymerase and which was labeled fluorescently.

[Claim 48]It is the reagent characterized by comprising the following labeled fluorescently, and an energy transfer fluorochrome is a structural formula.

A reagent chosen from a group which consists of a nucleoside, nucleoside monophosphate, nucleoside diphosphate, nucleoside triphosphate, an oligonucleotide, and an oligonucleotide analog which were embellished so that it might be combined with an energy transfer fluorochrome.

An energy transfer fluorochrome combined with a reagent.

[Formula 13]

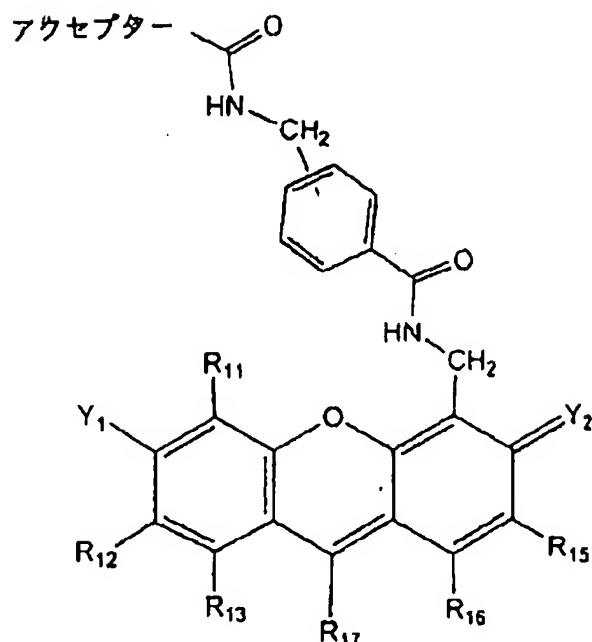


C(O) is a carbonyl group among a formula -- Y₁ and Y₂ -- respectively -- independent -- hydroxyl. It is chosen out of a group which consists of oxygen, iminium, and amine, and Z₁ NH, It is chosen out of a group which consists of sulfur and oxygen, and independently R₁₁ - R₁₇, respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, When alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring, And it is chosen out of a group which consists of such combination, and R₂₁ is C₁₋₅ alkyl, R₂₂ is the substituent chosen from a group which consists of condensed ring structure combined with a five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, coloring matter which can absorb excitation energy with which an acceptor was emitted by member of a xanthene class of coloring matter including a functional group to which R₂₈ combines a linker with an acceptor pigment -- it is -- a reagent containing coloring matter which it has labeled fluorescently.

[Claim 49]R₂₂ Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, Cyclohexadiene, a franc, thiofuran, pyrrole,

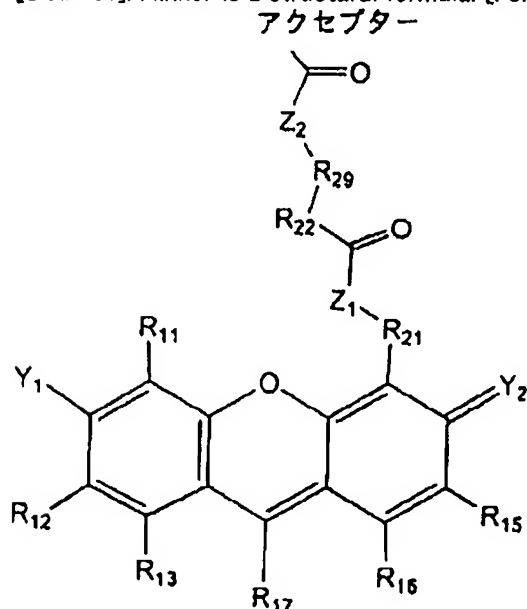
isopyrrole, Isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, The reagent according to claim 48 which are a five-membered ring or six membered-rings which were chosen from a group which consists of pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene and which was labeled fluorescently.

[Claim 50]Coloring matter is a structural formula. [Formula 14]



The reagent according to claim 48 which has (inside of formula and Z_2 is chosen from the group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R_{29} is C_{1-5} alkyl) and which was labeled fluorescently.

[Claim 51] A linker is a structural formula. [Formula 15]



The reagent according to claim 48 which **** and which was labeled fluorescently.

[Claim 52] The reagent according to claim 48 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter and which was labeled fluorescently.

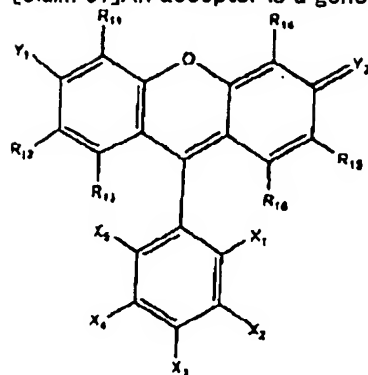
[Claim 53] The reagent according to claim 48 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which donor coloring matter becomes from fluorescein dye, rhodamine coloring matter, and an unsymmetrical benzo xanthene pigment and which was labeled fluorescently.

[Claim 54] The reagent according to claim 53 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter and which was labeled fluorescently.

[Claim 55] Donor coloring matter Carboxyfluorescein, 4, 7-dichlorofluorescein coloring matter, The reagent according to claim 48 which is chosen from a group which consists of an unsymmetrical benzo xanthene pigment, a rhodamine, a carboxy rhodamine, a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, and the carboxy R6G and which was labeled fluorescently.

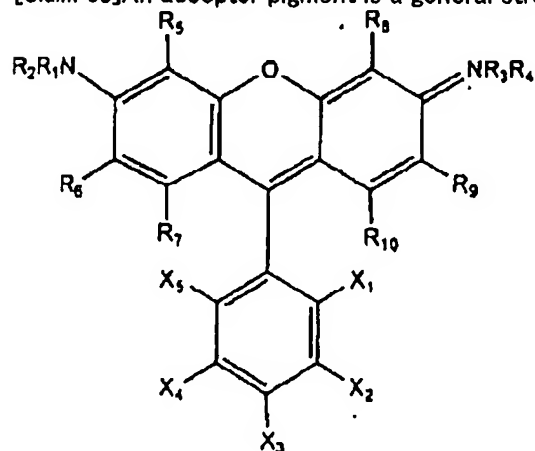
[Claim 56] An acceptor pigment 4,7-dichlorofluorescein coloring matter, an unsymmetrical benzo xanthene pigment, A rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, The reagent according to claim 48 which is chosen from a group which consists of a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, the carboxy R6G, a carboxy-X-rhodamine, and Cy5 and which was labeled fluorescently.

[Cláim 57]An acceptor is a general structural formula. [Formula 16]



(Among a formula, Y_1 and Y_2 are chosen from the group which consists of hydroxyl, oxygen, iminium, and amine independently, respectively, and) Independently $R_{11} - R_{16}$, respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, Carboxyl, alkyl, alkene, alkyne, sulfonate, and amino **, Ammonium, amide, nitril, alkoxy **, phenyl, substituted phenyl, It is chosen out of the group which consists of such combination, when a contiguity substituent is mixed and forms a ring, Independently $X_1 - X_5$, respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, Carboxyl, alkyl, alkene, alkyne, sulfonate, and amino **, when ammonium, amide, nitril, and an alkoxy ** contiguity substituent are mixed and form a ring, it is chosen out of the group which consists of such combination, and one of X_3 and the X_4 is combined with an R_{28} group -- **** -- the reagent according to claim 48 which it has and which was labeled fluorescently.

[Claim 58]An acceptor pigment is a general structural formula. [Formula 17]



(Among a formula, $R_1 - R_4$ are chosen from the group which consists of hydrogen and alkyl independently, respectively, and) Or R_1 , R_5 and R_2 , R_6 and R_3 , and R_7 , It is made together [the basis of R_4 and R_8] by one or more, form a ring, and independently $R_5 - R_{10}$, respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, a sulfone, amino **, ammonium, amide, It is chosen out of the group which consists of nitril, alkoxy **, phenyl, and substituted phenyl, Or it is made together [$R_5 - R_{10}$] by two or more, and one or more rings are formed, Independently X_1 , X_3 , and X_4 , respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, Bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, it is chosen out of a sulfone, amino **, ammonium, amide, nitril, or the group, alkoxy ** and others, and X_2 and X_5 are chlorine, and one of X_3 and the X_4 is combined with R_{28} -- **** -- the reagent according to claim 48 which it has and which was labeled fluorescently.

[Claim 59]The reagent according to claim 58 which is chosen so that $R_1 - R_{10}$, X_1 , X_3 , and X_4 may be equivalent to coloring matter chosen from a group which consists of DR110-2, DR6G-2, DTMR-2, and DROX-2 and which was labeled fluorescently.

[Claim 60]The reagent according to claim 48 which is chosen from a group which a reagent becomes from a guanine deoxyriboside, guanine deoxyriboside monophosphate, guanine deoxyriboside diphosphate, and guanine deoxyriboside triphosphate and which was labeled fluorescently.

[Claim 61]The reagent according to claim 60 which is chosen from a group which a deoxy nucleotide becomes from deoxy cytosine, a deoxyadenosine, deoxyguanosine, and a deoxythymidine and which was labeled fluorescently.

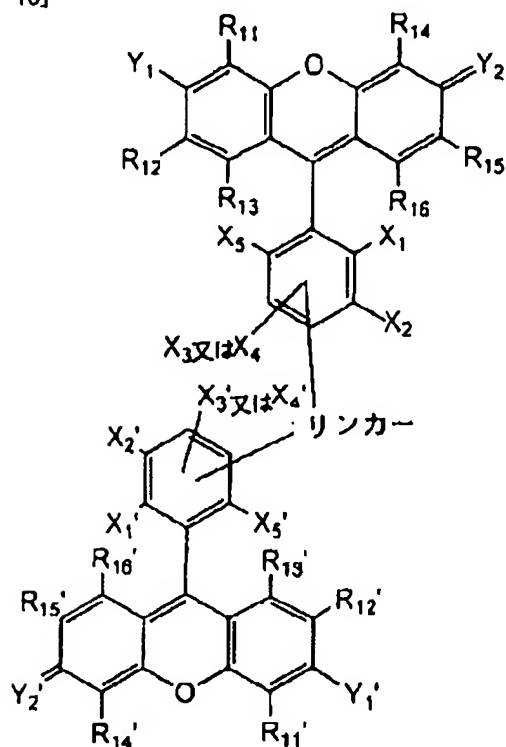
[Claim 62]The reagent according to claim 48 which is chosen from a group which a reagent becomes from a dideoxy nucleoside, dideoxy nucleoside monophosphate, dideoxy nucleoside diphosphate, and dideoxy nucleoside triphosphate and which was labeled fluorescently.

[Claim 63]The reagent according to claim 48 which is chosen from a group which a dideoxy nucleotide becomes from deoxy cytosine, a deoxyadenosine, deoxyguanosine, and a deoxythymidine and which was labeled fluorescently.

[Claim 64] The reagent according to claim 48 whose reagent is an oligonucleotide and which was labeled fluorescently.

[Claim 65] The reagent according to claim 64 which has a three-dash terminal extensible when an oligonucleotide uses polymerase and which was labeled fluorescently.

[Claim 66] A nucleoside embellished so that it might be combined with an energy transfer fluorochrome, A reagent chosen from a group which consists of nucleoside monophosphate, nucleoside diphosphate, nucleoside triphosphate, an oligonucleotide, and an oligonucleotide analog, It is the reagent containing an energy transfer fluorochrome combined with a reagent labeled fluorescently, and an energy transfer fluorochrome is a structural formula. [Formula 18]



a formula --- inside --- Y --- one --- Y --- one --- ' --- Y --- two --- and --- Y --- two --- ' --- respectively --- independent --- hydroxyl. It is chosen out of the group which consists of oxygen, iminium, and amine, and independently $R_{11}-R_{16}$ and $R_{11}'-R_{16}'$, respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, When alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring, It is chosen out of the group which consists of such combination, and independently X_1-X_5 and $X_1'-X_5'$, respectively And hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, It is chosen out of the group which consists of such combination, when an alkoxy ** contiguity substituent is mixed and forms a ring, Are chosen so that it may be equivalent to the donor coloring matter which $Y_1, Y_2, R_{11}-R_{16}$ and X_1-X_5 absorb the light of the first wave, and can answer and can release excitation energy, and $Y_1', Y_2', R_{11}'-R_{16}'$ and $X_1'-X_5'$ the excitation energy released with donor coloring matter, [absorb and] It is chosen so that it may be equivalent to the acceptor pigment which can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and --- X --- three --- and --- X --- four --- one --- a ** --- and --- X --- three --- ' --- and --- X --- four --- ' --- one --- a ** --- together --- carrying out --- having --- energy --- a donor --- from --- an acceptor pigment --- transferring --- having --- as --- a donor --- an acceptor pigment --- joining together --- a linker --- forming --- the reagent containing the coloring matter which it has labeled fluorescently.

[Claim 67] The reagent according to claim 66 which has a main chain (this is less than nine atoms in length) with which a linker combines a donor with an acceptor and which was labeled fluorescently.

[Claim 68] A linker is general formula $R_{25}Z_3C(O)$ (among a formula, by a X_3 or X_4 substituent, R_{25} is the C_{1-4} alkyl combined with donor coloring matter, and), Z_3 is NH, O, or S, and C(O) is a carbonyl group --- and an end carbonyl group --- X_3' or X_4' --- it is combined with an acceptor pigment by a substituent --- **** --- the reagent according to claim 66 which it has and which was labeled fluorescently.

[Claim 69] A linker is general formula $R_{25}Z_3C(O)$ (among a formula), $R_{26}Z_4C(O)$ R_{25} is the C_{1-4} alkyl combined with donor coloring matter by a X_3 or X_4 substituent, R_{26} is C_{1-4} alkyl and independently Z_3 and Z_4 , respectively NH, it is O or S and C(O) is a carbonyl group --- and an end carbonyl group --- X_3' or X_4' --- it is combined with an acceptor pigment by a substituent --- **** --- the reagent according to claim 66 which it has and which was labeled fluorescently.

[Claim 70] Are the reagent characterized by comprising the following labeled fluorescently, and an energy transfer fluorochrome 5 or 6 carboxy TMR-B-CF, 5 or 6 carboxy TMR-F-CF, 5, or 6 carboxy TMR-P-CF, 5 or 6 carboxy TMR-P-CF, 5, or 6 carboxy TMR-A-CF, 5 or 6 carboxy TMR-D-CF, 5, or 6 carboxy TMR-N-CF, 5 or 6 carboxy ROX-CF, CY5-CF, 5 or 6 carboxy TMR-gly-5AMF and 5, or 6 carboxy TMR-5AMF, A reagent which is chosen from a group which consists of 5 or 6 carboxy CF-B-TMR-2, 5 or 6 carboxy CFB-DR 110-2, 5 or 6 carboxy CFB-DR6g-2 and 5, or 6 carboxy CFB-DROX-2 and which was labeled fluorescently.

A reagent chosen from a group which consists of a nucleoside, nucleoside monophosphate, nucleoside diphosphate, nucleoside triphosphate, an oligonucleotide, and an oligonucleotide analog which were embellished so that it might be combined with an energy transfer fluorochrome.

An energy transfer fluorochrome combined with a reagent.

[Claim 71] The reagent according to claim 70 which is chosen from a group which a reagent becomes from a guanine deoxyriboside, guanine deoxyriboside monophosphate, guanine deoxyriboside diphosphate, and guanine deoxyriboside triphosphate and which was labeled fluorescently.

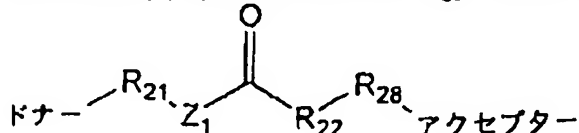
[Claim 72] The reagent according to claim 71 which is chosen from a group which a deoxy nucleotide becomes from deoxy cytosine, a deoxyadenosine, deoxyguanosine, and a deoxythymidine and which was labeled fluorescently.

[Claim 73] The reagent according to claim 70 which is chosen from a group which a reagent becomes from a dideoxy nucleoside, dideoxy nucleoside monophosphate, dideoxy nucleoside diphosphate, and dideoxy nucleoside triphosphate and which was labeled fluorescently.

[Claim 74] The reagent according to claim 70 whose reagent is an oligonucleotide and which was labeled fluorescently.

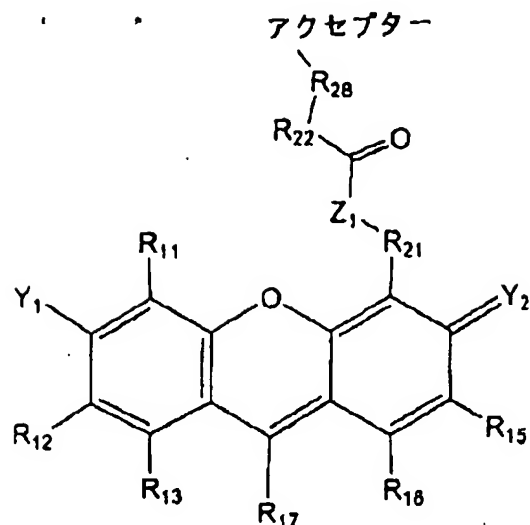
[Claim 75] The reagent according to claim 74 which has a three-dash terminal extensible when an oligonucleotide uses polymerase and which was labeled fluorescently.

[Claim 76] A nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, A mixture of a primer by which the sign was carried out extended by forming an oligonucleotide primer and a hybrid which were labeled fluorescently at least under existence of a kind of dideoxy nucleoside triphosphate and DNA polymerase is generated (the DNA polymerase). . Extend a primer by guanine deoxyriboside triphosphate until dideoxy nucleoside triphosphate which stops extension of a primer is taken in. It is the sequencing method of a nucleic acid sequence including determining arrangement of a nucleic acid sequence by separating an extended mixture of a primer and carrying out fluorometry of the generated mixture of a primer which was extended, Sequencing of the oligonucleotide primer labeled fluorescently is carried out, an oligonucleotide array of complementarity and an energy transfer fluorochrome combined with an oligonucleotide are included at a part of nucleic acid sequence which has a three-dash terminal extensible by polymerase, and an energy transfer fluorochrome is a structural formula. [Formula 19]



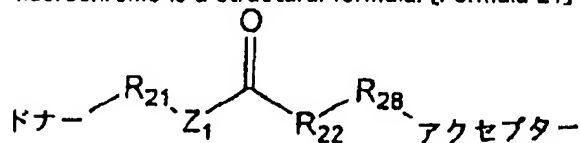
(Among a formula, a donor is coloring matter which absorbs light of the first wave, can answer and can release excitation energy, and) An acceptor absorbs excitation energy released with donor coloring matter. It is coloring matter which can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and C (O) is a carbonyl group, Z₁ is chosen from a group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R₂₁ is the C₁₋₅ alkyl combined with donor coloring matter, R₂₂ is the substituent chosen from a group which consists of condensed ring structure combined with a five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, and a functional group to which R₂₈ combines a linker with an acceptor pigment -- containing -- a sequencing method of a having nucleic acid sequence.

[Claim 77] A nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, A mixture of a primer by which the sign was carried out extended by forming an oligonucleotide primer and a hybrid which were labeled fluorescently at least under existence of a kind of dideoxy nucleoside triphosphate and DNA polymerase is generated (the DNA polymerase). . Extend a primer by guanine deoxyriboside triphosphate until dideoxy nucleoside triphosphate which stops extension of a primer is taken in. It is the sequencing method of a nucleic acid sequence including determining arrangement of a nucleic acid sequence by separating an extended mixture of a primer and carrying out fluorometry of the generated mixture of a primer which was extended, Sequencing of the oligonucleotide primer labeled fluorescently is carried out, an oligonucleotide array of complementarity and an energy transfer fluorochrome combined with an oligonucleotide are included at a part of nucleic acid sequence which has a three-dash terminal extensible by polymerase, and an energy transfer fluorochrome is a structural formula. [Formula 20]



C (O) is a carbonyl group among a formula -- Y_1 and Y_2 -- respectively -- independent -- hydroxyl. It is chosen out of a group which consists of oxygen, iminium, and amine, and Z_1 NH, It is chosen out of a group which consists of sulfur and oxygen, and independently $R_{11} - R_{17}$, respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, When alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring, And it is chosen out of a group which consists of such combination, and R_{21} is C_{1-5} alkyl, R_{22} is the substituent chosen from a group which consists of condensed ring structure combined with a five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, coloring matter which can absorb excitation energy with which an acceptor was emitted by member of a xanthene class of coloring matter including a functional group to which R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- it is -- a sequencing method of a having nucleic acid sequence.

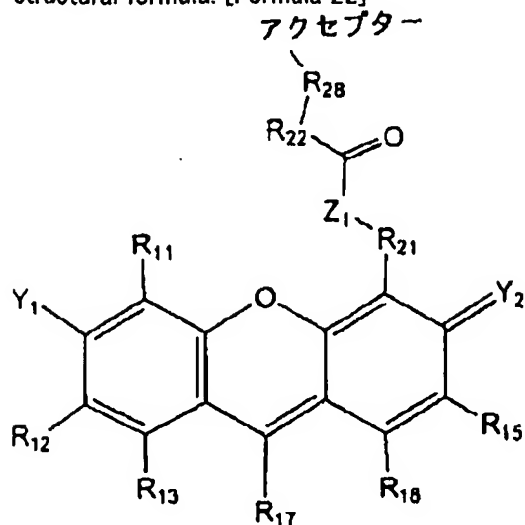
[Claim 78] A nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, A mixture of a primer extended by forming a primer and a hybrid at least under existence of a kind of dideoxy nucleoside triphosphate labeled fluorescently and DNA polymerase is generated (the DNA polymerase). . Extend a primer by guanine deoxyriboside triphosphate until it is taken into a primer by which dideoxy nucleoside triphosphate which stops extension of a primer, and which was labeled fluorescently was extended. It is the sequencing method of a nucleic acid sequence including determining arrangement of a nucleic acid sequence by detecting a dideoxy nucleotide which was combined with a mixture in which an extended mixture of a primer was separated and an extended primer was separated, and which was labeled fluorescently, Dideoxy nucleoside triphosphate labeled fluorescently contains dideoxy nucleoside triphosphate and an energy transfer fluorochrome combined with dideoxy nucleoside triphosphate, and an energy transfer fluorochrome is a structural formula. [Formula 21]



(Among a formula, a donor is coloring matter which absorbs light of the first wave, can answer and can release excitation energy, and) An acceptor absorbs excitation energy released with donor coloring matter, It is coloring matter which can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and C (O) is a carbonyl group, Z_1 is chosen from a group which consists of NH, sulfur, and oxygen, and R_{21} is the C_{1-5} alkyl combined with donor coloring matter, R_{22} is the substituent chosen from condensed ring structure combined with a five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, and a functional group to which R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- containing -- a sequencing method of a having nucleic acid sequence.

[Claim 79] A nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, A mixture of a primer extended by forming a primer and a hybrid at least under existence of a kind of dideoxy nucleoside triphosphate labeled fluorescently and DNA polymerase is generated (the DNA polymerase). . Extend a primer by guanine deoxyriboside triphosphate until it is taken into a primer by which dideoxy nucleoside triphosphate which stops extension of a primer, and which was labeled fluorescently was extended. It is the sequencing method of a nucleic acid sequence including determining arrangement of a nucleic acid sequence by detecting a dideoxy nucleotide which was combined with a mixture in which an extended mixture of a primer was separated and an extended primer was separated, and which was labeled fluorescently, Dideoxy nucleoside triphosphate labeled fluorescently contains dideoxy nucleoside triphosphate and an energy transfer fluorochrome combined with dideoxy nucleoside triphosphate, and the coloring matter is a

structural formula. [Formula 22]



C (O) is a carbonyl group among a formula -- Y_1 and Y_2 -- respectively -- independent -- hydroxyl. It is chosen out of a group which consists of oxygen, iminium, and amine, and Z_1 NH, It is chosen out of a group which consists of sulfur and oxygen, and independently $R_{11} - R_{17}$, respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, When alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring, And it is chosen out of a group which consists of such combination, and R_{21} is C_{1-5} alkyl, R_{22} is the substituent chosen from a group which consists of condensed ring structure combined with a five-membered ring and six membered-rings, or carbonyl carbons which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond, coloring matter which can absorb excitation energy with which an acceptor was emitted by member of a xanthene class of coloring matter including a functional group to which R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- it is -- a sequencing method of a having nucleic acid sequence.

[Translation done.]

NOTICES

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which an invention belongs] this invention -- a fluorochrome -- it is related with energy transfer fluorochromes and those use in more detail.

[0002]

[Description of the Prior Art] Various fluorochromes for carrying out the sign of the ingredient in a sample, and detecting it were developed. As for a fluorochrome, generally it is preferred to have a high quantum yield and a large absorbancy index, and, as a result, coloring matter can be used for detecting a little ingredients detected. As for a fluorochrome, it is preferred to have the large Stoke shift (namely, difference of the wavelength on which coloring matter has maximum absorbance, and the wavelength on which coloring matter has the maximum luminescence), and, as a result, it is easily distinguished from the light source used for firefly luminescence exciting coloring matter. One class of the developed fluorochrome is an energy transfer fluorochrome. Generally, an energy transfer fluorochrome contains a donor fluorescent substance and an acceptor fluorescent substance. When a donor fluorescent substance and an acceptor fluorescent substance approach mutually, and it receives mutually and it is located in suitable orientation, the energy-emitting from a donor fluorescent substance is absorbed with an acceptor fluorescent substance, and an acceptor fluorescent substance is made to show a fluorescence in these coloring matter. So, it is important that the excited donor fluorescent substance can absorb the excitation energy of a donor fluorescent substance effectively, and the energy can be transferred effective in an acceptor fluorescent substance. Various energy transfer fluorochromes were indicated in document. For example, U.S. Pat. No. 4,996,143, and WO 95/21266 have indicated the energy transfer fluorochrome with which the donor fluorescent substance and the acceptor fluorescent substance are combined by the oligonucleotide chain. Lee and others and Nucleic Acids Research 20:10 2471-2483 (1992) by the 4'-aminomethyl substituent of fluorescein. The energy transfer fluorochrome containing 5-carboxy rhodamine combined with 4'-aminomethyl 5-carboxyfluorescein is indicated.

[0003] Detection of the variety ingredient in the sample for which some diagnostic assays and analysis assay are developed, and these use a fluorochrome. For example, it is accompanied by flow cytometry (Lanier et al. and J.Immunol. 132 151-156 (1984)), chromosomal analysis (Gray and others, Chromosoma 739-37 (1979)), and DNA sequence determination. The target substance which it is desirable using simultaneously the group of two or more sorts of fluorochromes which can be decomposed in spectrum, and has them can detect simultaneously in a sample. [than a kind] [more / as a result / assays / these] The simultaneous detection of the variety ingredient in the sample which uses variety coloring matter shortens the time needed for detecting each ingredient in a sample continuously. In multigene seat DNA probe assay, use of the fluorochrome which can decompose a variety in spectrum decreases the number of the coils needed, simplifies an experiment protocol by that cause, and promotes manufacture of a use singularity kit. In automation DNA sequence determination, use of the fluorochrome which can decompose a variety in spectrum enables all the analysis of four bases in a single lane, increases a throughput rather than the monochrome method by that cause, and eliminates the indefinite element relevant to the electrophoretic mobility change within a lane. Connell and others and Biotechniques 5 342-348 (1987), Prober and others and Science 238 336-341 (1987), Smith and others and Nature 321 674-679 (1986) and Ansorge and others, and Nucleic Acids Research 15 4593-4602 (1989).

[0004] There are some difficulties relevant to obtaining the group of the fluorochrome for detecting the target substance of the variety in a sample simultaneously, especially the analysis which needs electrophoresis separation and processing by an enzyme, for example, DNA sequence determination. For example, it can be necessary to disassemble each coloring matter in the group in spectrum from other coloring matter. It is difficult for an emission spectrum to find out collection of the coloring matter disassembled in spectrum. If it becomes what, emission band half width typical to organic fluorescent dye will be about 40 to 80 NANOMETA (nm), and it will be because the width of an available spectrum is restricted by the excitation light source. The term of "spectrum decomposition" used for this Description about the group of coloring matter. The firefly luminescence bands of coloring matter fully differ, namely, it does not fully lap. The reagent with which coloring matter is combined, respectively, for example, polynucleotide, uses the usual optical detection system. For example, U.S. Pat. No. 4,230,558, 4,811,218, By or Wheelless and others, pgs.21-76, and Flow Cytometry:Instrumentation and Data Analysis (Academic Press, New York, 1985). It means that it can distinguish based on the fluorescent signal produced with each coloring matter using systems which are illustrated by the indicated system, such as a group of a band pass filter and a photo-multiplier, an electric charge coupling device, and spectrograph.

[0005] The fluorescent signal of each coloring matter needs to be strong enough so that each ingredient can detect by sufficient sensitivity. For example, in DNA sequence determination, the sample charge which increased cannot serve as a guarantee of low fluorescence efficiency (Pringle and others, DNA CoreFacilities Newsletter, and 1 15-21 (1988)). Generally the fluorescent signal produced with coloring matter is the maximum, when coloring matter is excited by the absorbance maximum. So, as for each coloring matter, being mostly excited by the absorbance maximum is preferred. It is a thing relevant to use of the group of coloring matter for which, as for another difficulty, coloring matter generally does not have the same absorbance maximum. When the group of coloring matter which does not have the same absorbance maximum is used, an agreement arises between the low sensitivity produced from the high cost relevant to preparing many light sources for exciting each coloring matter by the absorbance maximum, and each coloring matter not being excited by the absorbance maximum. In addition to the above-mentioned difficulty, the electric charge of coloring matter, molecular size, and conformation must not carry out an adverse effect to the electrophoretic mobility of fragmentation. Fluorochromes need to be the chemicals used for producing or operating fragmentation, for example, a DNA synthesis solvent, a reagent, buffer solution, polymerase enzyme, a ligase enzyme, etc. and conformity. In the field of 4 color DNA sequence determination, only the group with few fluorochromes was especially developed for the restraint at many of times of developing the group of coloring matter for a multicolor use. Connell and others and Biotechniques 5 342-348 (1987), Prober and others, Science 238336-341 (1987) and Smith and others, and Nature 321 674-679 (1986).

[0006] One class of the fluorochrome understood that a multicolor use is useful is rhodamine coloring matter (TAMRA), for example, a tetramethyl rhodamine, the rhodamine X (ROX), rhodamine 6G (R6G), the rhodamine 110 (R110), etc. U.S. Pat. No. 5,366,860. Especially rhodamine coloring matter is attractive about a fluorochrome. If it becomes what, (1) rhodamine will be light stability from fluorescein typically, (2) A rhodamine sign dideoxy nucleotide is a substrate good to thermal stability polymerase enzyme, and it is because the emission spectrum of (3) rhodamine coloring matter is remarkable to the red (high wavelength) of fluorescein. Especially in the situation of a multiplex detecting method, one fault relevant to the rhodamine coloring matter which may be obtained now is a comparatively large emission spectrum of rhodamine coloring matter. This large emission spectrum restricts the spectral resolution between near coloring matter on a spectrum, and makes difficult the multicomponent analysis of such a coloring matter combination. The second fault relevant to the rhodamine coloring matter which may be obtained now, Those absorption spectra are not suiting the wavelength of the solid-state frequency two-times green diode laser which may be obtained now, for example, the neodymium solid-state YAG laser which has a luminescence line at about 532 nm. It is dramatically advantageous to use such laser because of use with those compact sufficient sizes, long service life, and efficiency of an output.

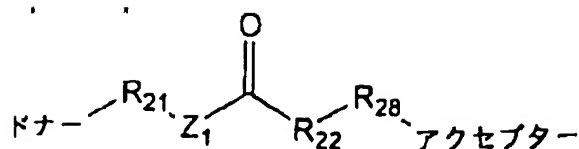
[0007] An energy transfer fluorochrome has some features which make them attractive to the use in the simultaneous detection, for example, the DNA sequence determination, of a variety target substance in a sample. For example, a monochrome donor fluorescent substance can be used in the group of an energy transfer fluorochrome so that each coloring matter may have strong absorption on common wavelength. It may be then generated by changing an acceptor fluorescent substance in energy transfer coloring matter by a series of energy transfer coloring matter which has the firefly luminescence which can be decomposed in spectrum. An energy transfer fluorochrome gives the effective larger Stoke shift than a non-energy transfer fluorochrome. This is because the Stoke shift about an energy transfer fluorochrome is based on the difference of the wavelength to which a donor fluorescent substance absorbs light to the maximum, and the wavelength on which an acceptor fluorescent substance emits light to the maximum. Generally, the request to the fluorochrome which has a big Stokes shift consists. It depends for the sensitivity of the assay which uses a fluorochrome on the strength of the fluorescent signal produced by the fluorochrome. So, the request to the fluorochrome which has a strong fluorescent signal consists. The fluorescent signal strength of these coloring matter is dependent on how an acceptor fluorescent substance absorbs the energy-emitting of a donor fluorescent substance effectively about an energy transfer fluorochrome. This is dependent on various variables which include contiguity of the donor fluorescent substance to an acceptor fluorescent substance, and the orientation of the donor fluorescent substance to an acceptor fluorescent substance in order. So, the request to an energy transfer fluorochrome [as / whose orientation of a donor fluorescent substance and an acceptor fluorescent substance is what is effectively transferred to energy between a donor fluorescent substance and an acceptor fluorescent substance] consists.

[0008]

[Means for Solving the Problem] This invention relates to a linker for combining donor coloring matter with an acceptor pigment in an energy transfer fluorochrome. This invention relates to an energy transfer fluorochrome which has the reinforced fluorescence. This invention relates to a kit in which the directions for a reagent containing energy transfer coloring matter of this invention, coloring matter, and a reagent, coloring matter, and a reagent are contained. One linker of this invention for combining donor coloring matter with an acceptor pigment in an energy transfer fluorochrome, General structural-formula $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{28}$ which is explained below (among a formula) R_{21} is the C_{1-5} alkyl combined with donor coloring matter, $C(O)$ is a carbonyl group and Z_1 is NH, sulfur, or oxygen, a functional group to which R_{22} is the substituent combined with carbonyl carbons which may be an alkene, diene, an alkyne, a five-membered ring that has at least one unsaturated bond, six membered-rings, or condensed ring structure, and R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- containing -- it has.

[0009]

[Formula 23]



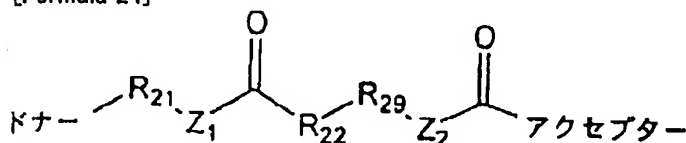
[0010] R_{28} groups used into a linker may be all bases known for this industry that can use an R_{22} group for combining with an acceptor pigment. Typically, an R_{28} group will be combined with the benzene ring of an acceptor pigment, or other aromatic ring structures. R_{28} in the benzene ring of an acceptor pigment, or other aromatic ring structures So, an electrophile functional group, For example, carboxylic acid, acid halide, sulfonic acid, ester, aldehyde, Thio, disulfide, an isothiocyanate, an isocyanate, sulfonyl halide, It is preferred to be formed by forming maleimide, hydroxysuccinimide ester, halo acetyl, hydroxysulfosuccinimide ester, imidester, hydrazine, azide nitrophenyl, and azide. An R_{22} group can be then added to an acceptor pigment in front of combination of donor coloring matter to an R_{22} group, or in the back by making an electrophile agent of an acceptor pigment react to a nucleophilic object, for example, amino ** hydroxyl, or a sulfhydryl nucleophilic object.

[0011]

[Embodiment of the Invention] For example, in the embodiment explained below, a linker is general structural-formula $\text{R}_{21}\text{Z}_1\text{C}(=\text{O})$ (among a formula). $\text{R}_{22}\text{R}_{29}\text{Z}_2\text{C}(=\text{O})$ R_{21} and R_{22} are as above-mentioned, Z_1 and Z_2 are NH, sulfur, or oxygen independently, respectively, R_{29} is C_{1-5} alkyl, and an end carbonyl group is combined with the ring structure of an acceptor pigment --- **** --- it has. In change whose Z_2 is nitrogen, a $\text{C}(=\text{O})\text{R}_{22}\text{R}_{29}\text{Z}_2$ subunit forms an amino acid subunit.

[0012]

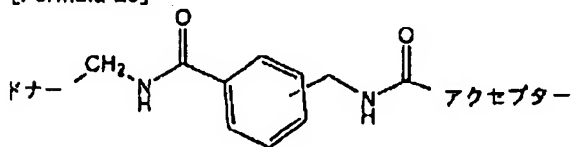
[Formula 24]



[0013] A linker may be generated by the reaction of an activation carbonyl group (NHS ester), an amine group and hydroxyl, or a thiol group in this embodiment. The mechanism of others of the variety for combining an R_{22} group with an acceptor pigment can be considered, and having intention of entering within the limits of this invention attracts attention. As a special example of the five-membered ring which can be used as R_{22} in a linker, or six membered-rings, Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, cyclohexadiene, Although a franc, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN, and oxazine are mentioned, it is not limited to these. Although indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene are mentioned as an example of condensed ring structure, it is not limited to these. The desirable embodiment of this linker is a case where R_{21} and R_{29} are methylene, and Z_1 and Z_2 are NH(s), and R_{22} is benzene, as shown below.

[0014]

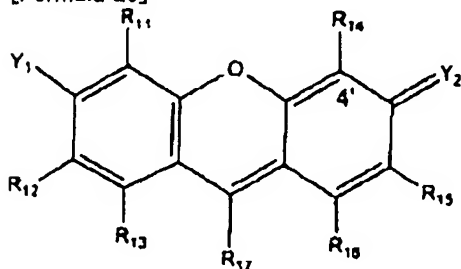
[Formula 25]



[0015] One class of the energy transfer fluorochrome of this invention contains in 4' ring position the donor coloring matter which has the following xanthene ring structure.

[0016]

[Formula 26]

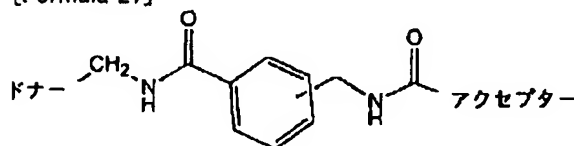


[0017] Among a formula, Y_1 and Y_2 are made separate, and are hydroxyl, oxygen, iminium, or amine, and, as for

iminium and amine, it is preferred that they are iminium of the third class or amine. R_{11} - R_{17} may be all substituents that are the energy transfer coloring matter and conformity of this invention, and in order that R_{11} - R_{17} may change the spectral characteristics and the mobility characteristic of coloring matter, that it may change widely attracts attention. According to this embodiment, energy transfer coloring matter contains the acceptor pigment which absorbs the excitation energy released with donor coloring matter again, answers and shows a fluorescence by secondary wave length. Energy transfer coloring matter contains the linker which combines donor coloring matter with an acceptor pigment. In one change of this embodiment of energy transfer coloring matter, a linker is general structural-formula $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{28}$ (among a formula) as mentioned above. R_{21} is the C_{1-5} alkyl combined at least with 4' of xanthene donor coloring matter, $C(O)$ is a carbonyl group and Z_1 is NH, sulfur, or oxygen, the functional group to which R_{22} is the substituent combined with the carbonyl carbons which may be an alkene, diene, an alkyne, a five-membered ring that has at least one unsaturated bond, six membered-rings, or condensed ring structure, and R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- containing -- it has. In another change of this embodiment of energy transfer coloring matter, a linker is general structural-formula $R_{21}Z_1C(O)$ (among a formula) as mentioned above. $R_{22}R_{29}Z_2C(O)R_{21}$ and R_{22} are as above-mentioned, Z_1 and Z_2 are NH, sulfur, or oxygen independently, respectively, R_{29} is C_{1-5} alkyl, and an end carbonyl group is combined with the ring structure of an acceptor pigment -- **** -- it has. In change which is nitrogen, Z_2 is $-C(O)$. $R_{22}R_{29}Z_2-$ forms an amino acid subunit. In another desirable change of this embodiment of energy transfer coloring matter, a linker is a case where R_{21} and R_{29} are methylene, and Z_1 and Z_2 are NH(s), and R_{22} is benzene, as shown below.

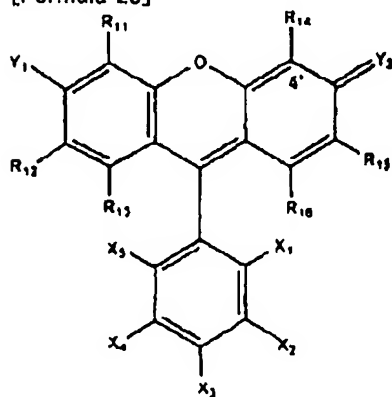
[0018]

[Formula 27]



[0019] Donor coloring matter may be a member of the class of the coloring matter whose R_{17} is phenyl or substituted phenyl by necessity. When Y_1 is hydroxyl, Y_2 is oxygen and R_{17} is phenyl or substituted phenyl, the coloring matter is a member of the fluorescein class of coloring matter. When Y_1 is amine, Y_2 is iminium and R_{17} is phenyl or substituted phenyl, the coloring matter is a member of the rhodamine class of coloring matter. According to this embodiment, an acceptor pigment may be a member of the xanthene class of coloring matter, a cyanine class, a phthalocyanine class, and a squaraine class by necessity. In another embodiment, an energy transfer fluorochrome is a general structural formula. [0020]

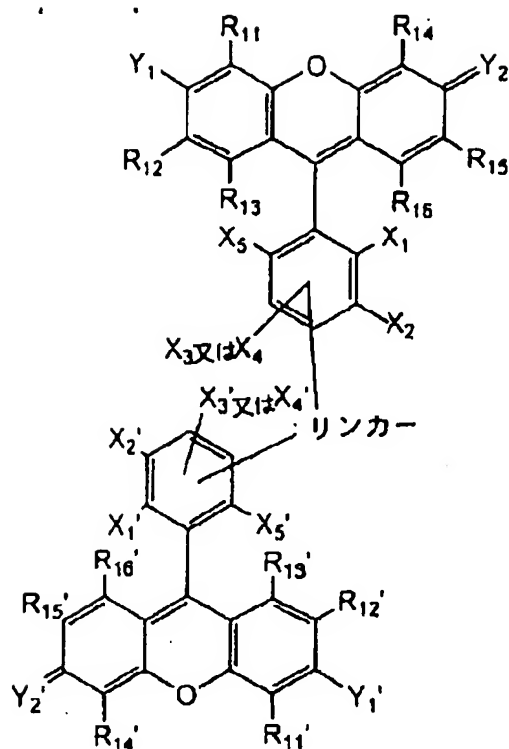
[Formula 28]



[0021] It has the donor coloring matter and the acceptor pigment which ****. Among a formula, Y_1 and Y_2 are made separate, and are hydroxyl, oxygen, iminium, or amine. As for iminium and amine, it is preferred that they are iminium of the third class or amine, and R_{11} - R_{17} are all substituents that are the energy transfer coloring matter and conformity of this invention. this operative condition -- if it depends like, it will be explained below -- as -- a linker -- each X_3 substituent of donor coloring matter and an acceptor pigment, and a X_4 substituent -- it is preferably combined with the X_3 substituent of donor coloring matter and an acceptor pigment by one. In this embodiment, a linker is short and it is preferred that it is/or hard. It is because it turned out that this increases transition of the energy between donor coloring matter and an acceptor pigment when becoming what.

[0022]

[Formula 29]



[0023]The donor coloring matter whose energy transfer fluorochrome is a member of the xanthene class of coloring matter in another embodiment, The xanthene class of the coloring matter which absorbs the excitation energy released with donor coloring matter, can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, The linker which combines with an acceptor pigment the acceptor pigment which is a member of a cyanine class, a phthalocyanine class, and a squaraine class, and donor coloring matter is included. According to this embodiment, an acceptor has the luminescence maximum larger than about 600 nm or larger at least about 100 nm than the absorbance maximum of donor coloring matter. It adds to the above-mentioned new energy transfer fluorochrome, and this invention relates to the fluorescence reagent which contains an energy transfer fluorochrome again. Generally, these reagents can combine the energy transfer coloring matter of this invention, and contain all the molecules or substances that can be used for detecting existence of a reagent based on the fluorescence of energy transfer coloring matter. The fluorescence reagent containing the nucleoside or mono-, di-, or the triphosphate nucleotide by which set like 1 operative condition and the sign was carried out by the energy transfer fluorochrome is provided. A nucleotide may be a deoxy nucleotide which can be used for preparation of a coloring matter sign oligonucleotide, for example. A nucleotide may be a dideoxy nucleoside which can be used for coloring matter terminator sequencing, for example. In another embodiment, a fluorescence reagent contains the oligonucleotide by which the sign was carried out by the energy transfer fluorochrome. These reagents can be used for coloring matter primer sequencing, for example.

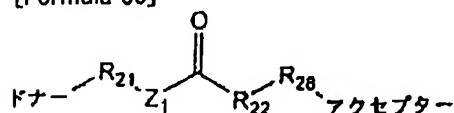
[0024]This invention relates to a method of using energy transfer coloring matter and a reagent of this invention. Set like 1 operative condition and the method generates an oligonucleotide of different size of a series by which the sign was carried out with energy transfer coloring matter of this invention, It includes detecting an oligonucleotide which separated a series of oligonucleotides by which the sign was carried out based on size, and was separated based on fluorescence of energy transfer coloring matter and by which the sign was carried out. This method sets like 1 operative condition, and an extended mixture of a primer by which the sign was carried out Deoxy nucleotide triphosphate, And a nucleic acid sequence is generated by forming an oligonucleotide primer and a hybrid at least under existence of a kind of dideoxy nucleotide triphosphate by which the coloring matter sign was carried out, and DNA polymerase. DNA polymerase can be used for extending a primer by deoxy nucleotide triphosphate until dideoxy nucleotide triphosphate which stops extension of a primer is taken in. Once it stops, an extended mixture of a primer will be separated and it will be detected based on fluorescence of coloring matter of a dideoxy nucleoside. In change of this embodiment, four sorts of different dideoxy nucleotide triphosphate labeled fluorescently, That is, dideoxy cytosine triphosphate labeled fluorescently, dideoxy adenosine triphosphate labeled fluorescently, dideoxy guanosine triphosphate labeled fluorescently, and dideoxy thymidine triphosphate labeled fluorescently are used. In another embodiment of this method, an oligonucleotide primer is labeled fluorescently contrary to guanine deoxyriboside triphosphate. This invention relates to a kit containing coloring matter and a reagent for making a DNA sequence decision using coloring matter and a reagent of this invention.

[0025]I. Energy transfer coloring matter linker this invention of this invention relates to a new linker for combining donor coloring matter with an acceptor pigment in an energy transfer fluorochrome. This invention relates to an energy transfer fluorochrome containing these linkers. It turned out that these linkers increase effective transition of energy between donor coloring matter and an acceptor pigment in energy transfer coloring matter. General structural-formula $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{28}$ one linker of this invention for combining donor coloring matter with an

acceptor pigment in an energy transfer fluorochrome is explained to be below (among a formula) R_{21} is the C_{1-5} alkyl combined with donor coloring matter, $C(O)$ is a carbonyl group and Z_1 is NH, sulfur, or oxygen, a functional group to which R_{22} is a substituent including condensed ring structure combined with a five-membered ring which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond and six membered-rings, or carbonyl carbons, and R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- containing -- it has.

[0026]

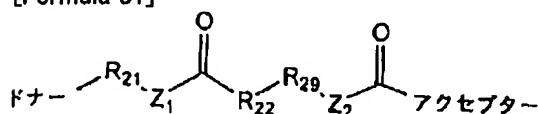
[Formula 30]



[0027] A linker is general structural-formula $R_{21}Z_1C(O)$ (among a formula) so that this linker may set like 1 operative condition and it may be explained below. $R_{22}R_{29}Z_2C(O)$ R_{21} and R_{22} are as above-mentioned, Z_1 and Z_2 are NH, sulfur, or oxygen independently, respectively, R_{29} is C_{1-5} alkyl, and an end carbonyl group is combined with a ring structure of an acceptor pigment -- **** -- it has. In change whose Z_2 is nitrogen, a $C(O)R_{22}R_{29}Z_2$ subunit forms an amino acid subunit.

[0028]

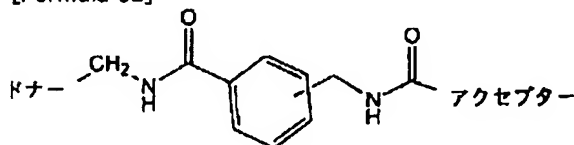
[Formula 31]



[0029] As a special example of the five-membered ring which can be used as R_{22} in a linker, or six membered-rings, Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, cyclohexadiene, Although a franc, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN, and oxazine are mentioned, it is not limited to these. Although indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene are mentioned as an example of condensed ring structure, it is not limited to these. The desirable embodiment of this linker is a case where R_{21} and R_{29} are methylene, and Z_1 and Z_2 are NH(s), and R_{22} is benzene, as shown below.

[0030]

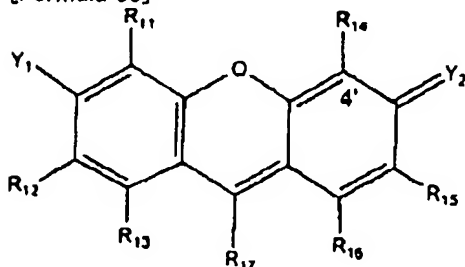
[Formula 32]



[0031] Linker which can use Table 3 into the linker of this invention - $C(O)R_{22}$ - The example of a subunit is shown.

II. The energy transfer coloring matter of this invention absorbs the light of the first wave to the general energy transfer coloring matter of this invention. The linker which combines with an acceptor pigment the acceptor pigment which absorbs the excitation energy released with the donor coloring matter which answers and releases excitation energy, and donor coloring matter, can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and donor coloring matter is included. Such molecular structure not only includes the shown exact electronic structure, but it has intention of including all those resonating structures and protonation states about all the molecular structure shown in this Description. One class of the energy transfer fluorochrome of this invention contains the linker which is a member of the group of the linker indicated in the donor coloring matter, the acceptor pigment, and Section I which are the members of the xanthene class of coloring matter. The xanthene pigment used for this Description is a general structural formula. [0032]

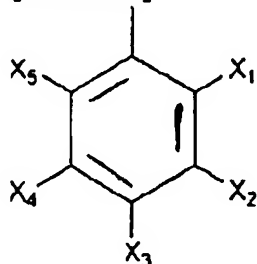
[Formula 33]



[0033] All the molecules which **** are included. Among a formula, Y_1 and Y_2 are made separate, and are hydroxyl, oxygen, iminium, or amine, and, as for iminium and amine, it is preferred that they are iminium of the third class or

amine. When Y_1 is hydroxyl, Y_2 is oxygen and R_{17} is phenyl or substituted phenyl, the coloring matter is a member of the fluorescein class of coloring matter. And Y_1 is amine, when Y_2 is iminium and R_{17} is phenyl or substituted phenyl, the coloring matter is a member of the rhodamine class of coloring matter. R_{11} - R_{17} may be all substituents that are the energy transfer coloring matter and conformity of this invention, and in order that R_{11} - R_{17} may change the spectral characteristics and the mobility characteristic of coloring matter, that it may change widely attracts attention. The number shown in the ring structure shows at least 4' of xanthene ring structure. About the energy transfer coloring matter of this invention in which the linker is combined at least with 4' of xanthene ring structure, an R_{14} subunit is equivalent to a linker. As an example of an R_{11} - R_{17} substituent, hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, When iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring, such combination is mentioned, but it is not limited to these. Setting like 1 operative condition, R_{15} and R_{16} are mixed and form substitution or a non-substituted benzene ring. This class of a xanthene pigment is called an unsymmetrical-among this Description benzo xanthene pigment. It is indicated to U.S. patent application 08th for which Scott C.Benson and others applied on April 1, 1996 / No. 626,085 (Title of invention: unsymmetrical benzo xanthene pigment), and this patent is included in this Description as reference. In another embodiment, R_{17} is a general formula. [0034]

[Formula 34]



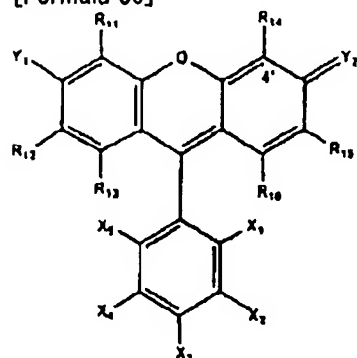
[0035] It is phenyl or substituted phenyl which ****. As substituent X_1 - X_5 of a phenyl ring, hydrogen, fluoride, chlorine, Such combination is mentioned, when bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, and an alkoxy ** contiguity substituent are mixed and form a ring. It sets like 1 operative condition and he is a member of the class of the coloring matter whose Y_1 is amine, whose Y_2 is iminium and whose X_2 and X_5 are chlorine by whom donor coloring matter is called 4,7in this Description-dichloro rhodamine coloring matter. The coloring matter which enters in the 4,7-dichloro rhodamine class of coloring matter, and those composition are indicated to U.S. patent application 08th for which it applied on this Description and June 27, 1996 / No. 672,196 (Title-of-invention Title of invention: 4,7-dichloro rhodamine coloring matter), This patent is included in this Description as reference.

[0036] Alkyls used here are [tert-/ a straight chain and a branching hydrocarbon portion, i.e., methyl, ethyl, propyl, isopropyl, and]. tert-[butyl, isobutyl, sec-butyl, neopentyl one, and] Pentyl etc. are expressed. Although substituted alkyl contains hydroxy ** amino ** thio, cyano, nitro, sulfo, etc., an alkyl part replaced by any one of the various substituents which are not limited to these is expressed. Halo alkyl expresses one or more halogen atom substituents and substituted alkyl which usually has fluoro, chloro, bromo, or iodo. An alkene expresses hydrocarbon whose non-double bond carbon one or more of the carbon-carbon bondings are double bonds, and is alkyl or substituted alkyl. As for an alkyne, one or more of the carbon are combined by a triple bond, and non-triple bond carbon expresses hydrocarbon which is an alkyl part or a substituted alkyl portion. Sulfonate expresses a portion (the mono- and a di-salt are included), for example, sodium sulfonate, containing a sulfur atom combined with three oxygen atoms, potassium sulfonate, disodium sulfonate, etc. A hydrogen atom of two amino **, an alkyl part, or a portion containing a nitrogen atom combined with all such combination is expressed. The double bond of the amide is carried out to an oxygen atom, and it expresses a portion containing a carbon atom by which the single bond was carried out to an amino portion. Nitril expresses a portion containing a carbon atom by which the triple bond was carried out to a nitrogen atom. A portion containing an alkyl part by which the single bond was carried out to alkoxy ***** is expressed. Aryl is single or expresses much phenyl or substituted phenyl, for example, benzene, naphthalene, anthracene, biphenyl, etc.

[0037] R_{11} - R_{17} may be the connecting parts which can use energy transfer coloring matter for combining with a reagent, for example, a nucleotide, a nucleoside, or an oligonucleotide independently again, respectively. As an example of a connecting part, when a complementary functional group is always amine, an isothiocyanate, sulfonyl chloride, 4,6-dichloro thoriadinyl amine, succinimidyl ester, or other activity carboxylate is mentioned. As for bond groups, when a complementary functional group is always the sulfhydryl, it is preferred that they are maleimide, halo acetyl, or an iodoacetamide. Refer to R.Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular probes, Inc. (1992) . Especially, in a desirable embodiment, as shown in drawing 1, Bond groups is the activation NHS ester generated from one carboxyl group of donor coloring matter or acceptor pigments which can generate an oligonucleotide primer by which was made to react to aminohexyl-oligomer and the coloring matter sign was carried out. An energy transfer fluorochrome of this embodiment contains a linker which combines with an acceptor pigment an acceptor pigment which absorbs excitation energy released with donor coloring matter again,

can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and donor coloring matter. In the first class of energy transfer coloring matter, a linker is a member of a class of a linker indicated in Section I, and is combined with donor coloring matter at least by 4' of xanthene ring structure. Energy transfer coloring matter of this first class shows fluorescence strength reinforced as compared with an energy transfer fluorochrome (in this case, combination between donor acceptor pairs differs) which has the same acceptor fluorescent substance itself and donor acceptor pair. As for this invention, donor coloring matter and an acceptor pigment are general structural formulae, respectively. [0038]

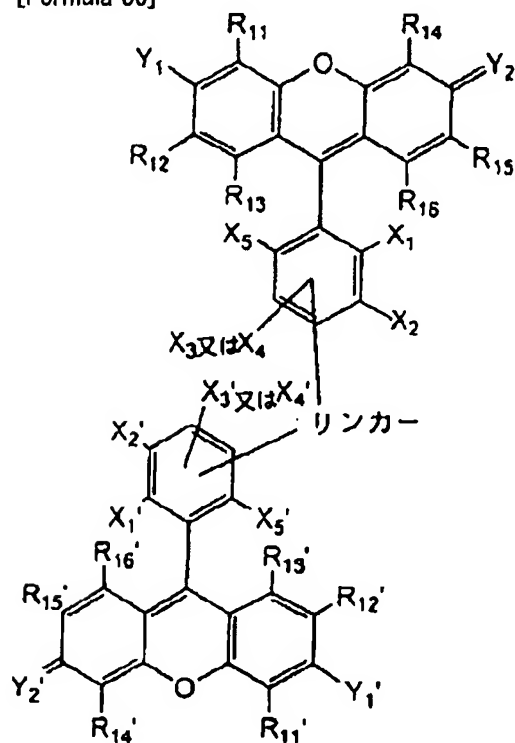
[Formula 35]



[0039] It is related with the second class of the energy transfer fluorochrome which has (the inside of a formula, Y_1 , Y_2 , R_{11} - R_{16} and X_1 - X_5 are as having been specified previously). A linker is combined with donor coloring matter and an acceptor pigment in this class of coloring matter by one of each X_3 substituent of donor coloring matter and an acceptor pigment, and the X_4 substituents.

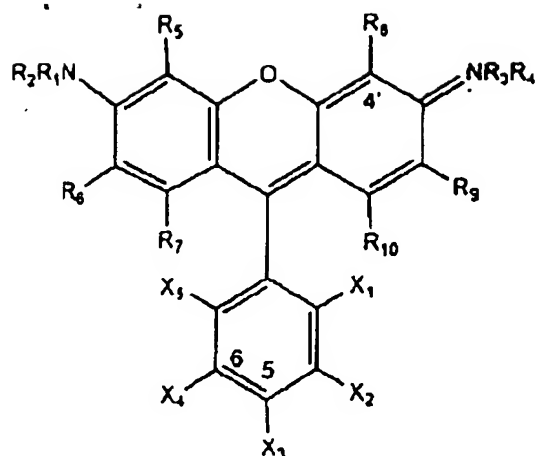
[0040]

[Formula 36]



[0041] A linker is combined with donor coloring matter and an acceptor pigment by each X_3 substituent of donor coloring matter and an acceptor pigment in the desirable embodiment of this class of coloring matter. In this class of coloring matter, a linker is short and it is preferred that it is/or hard. It is because it turned out that this increases transition of the energy between donor coloring matter and an acceptor pigment when becoming what. This invention relates to the third class of the energy transfer fluorochrome whose acceptor pigment is a member of the 4,7-dichloro rhodamine class of coloring matter, and the coloring matter is a general structural formula. [0042]

[Formula 37]

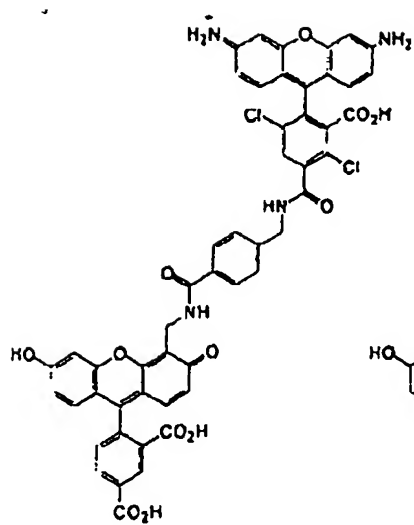


[0043]It ****. Independently $R_1 - R_4$ among a formula, respectively Hydrogen, alkyl, or R_1 and R_5 . When R_2 , R_6 and R_3 , R_8 and R_4 , and R_9 are mixed and form a ring, Are such combination and independently $R_5 - R_{10}$, respectively And hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, a sulfone, amino ** ammonium, amide, When nitril, alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, or a contiguity substituent is mixed and forms a ring, Are such combination and independently X_1 , X_3 , and X_4 , respectively And hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, When alkyne, sulfonate, sulfone, amino ** ammonium, amide, nitril, or alkoxy ** or a contiguity substituent is mixed and forms a ring, it is such combination and X_2 and X_5 are chlorine. About $R_1 - R_{10}$, X_3 , and X_4 , R_1 , R_5 and R_2 , R_6 and R_3 , R_8 and R_4 , R_9 , and X_3 and X_4 are mixed respectively independently, and may form a five-membered ring, six membered-rings, or seven membered-rings. The number (4, 5, 6) shown in the ring structure shows the position of the ring of 4, 5, and 6 of a rhodamine ring structure. As explained in this Description, the position of the ring of 4 and 5 is a part desirable to combination of the linker used into the energy transfer coloring matter of this invention which combines a donor fluorescent substance with an acceptor fluorescent substance. The position of the ring of 4, 5, and 6 is a part desirable to combination of the living thing molecule to energy transfer coloring matter, for example, a nucleotide, and an oligonucleotide again.

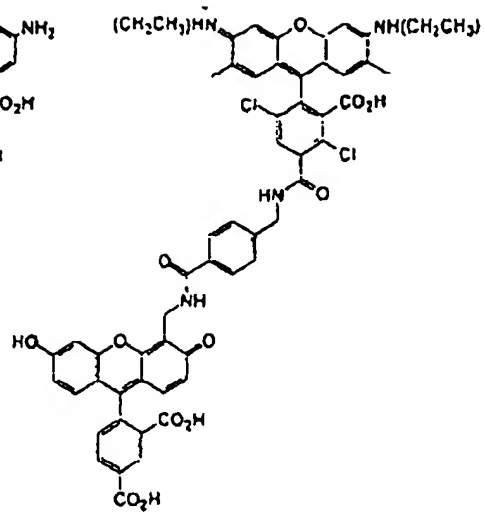
[0044]All coloring matter that releases excitation energy may be included, that 4,7-dichloro rhodamine coloring matter absorbs energy, and the donor coloring matter in this class of energy transfer coloring matter can answer, and can produce energy-emitting. It sets like 1 operative condition and, as for donor coloring matter, a 4,7-dichloro rhodamine acceptor pigment has xanthene ring structure at least with 4'4 combined with donor coloring matter by linker combined at least with ring' ring of a xanthene pigment. As for a linker, it is preferred that at least five rings of a 4,7-dichloro rhodamine acceptor pigment are combined with about 6 rings. Energy transfer coloring matter of this third class (namely, when a 4,7-dichloro rhodamine is an acceptor pigment) of coloring matter gives an advantage of having a comparatively narrow emission spectrum compared with other rhodamine coloring matter. This narrow emission spectrum increases spectral resolution obtained by group of these coloring matter, and promotes a multicomponent analysis which uses these coloring matter by that cause. This invention is a thing about the fourth class of an energy transfer fluorochrome, Donor coloring matter is a member of a xanthene class of coloring matter, and an acceptor pigment In this case, a xanthene class of coloring matter, It is a member of a cyanine class, a phthalocyanine class, and a squaraine class, and it has the discharge maximum with a larger acceptor than about 600 nm, and has/or the desirable discharge maximum larger at least about 100 nm than the absorbance maximum of donor coloring matter. As for a donor, in this class of coloring matter, it is preferred that he is a member of a fluorescein class of coloring matter. The fourth class of energy transfer coloring matter of this invention is measured according to a difference of discharge a donor's ***** acceptor, and usually shows the large Stoke shift. In addition, these coloring matter shows effective energy transfer with a point that the minimum donor fluorescence is observed. The fourth class of energy transfer coloring matter of this invention is written in more detail in this Description.

[0045]

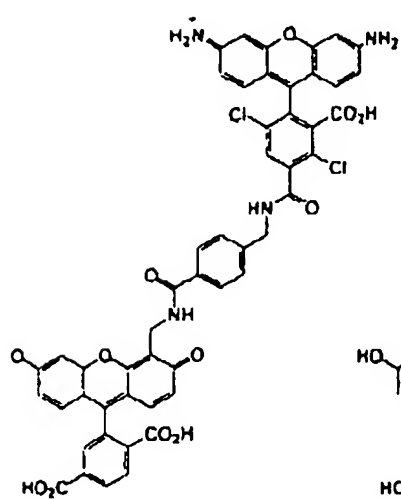
[Formula 38]



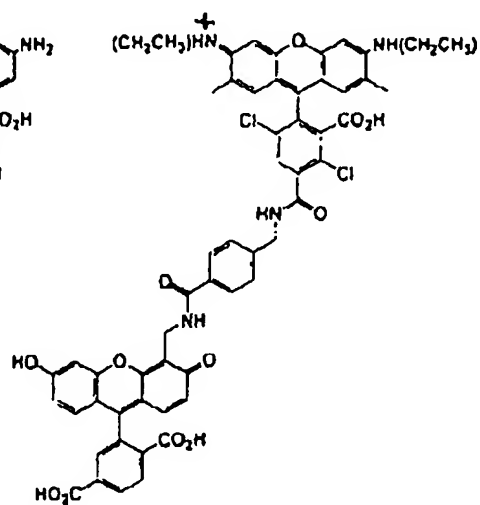
5.CFB-DR110-2



5-CFB-DR6G-2



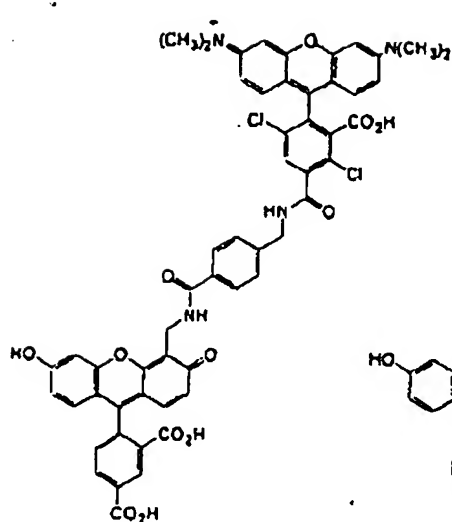
~~6-CFB-DR110-2~~



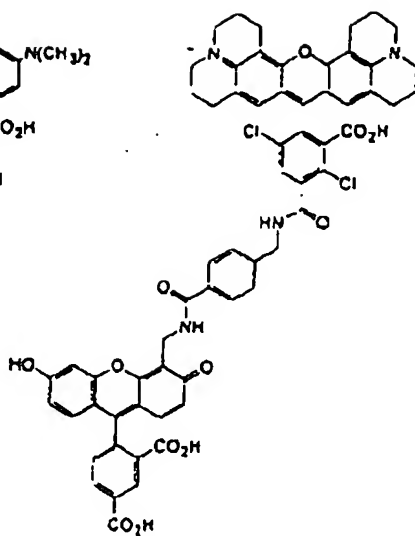
~~6-CFB-DR6G-2~~

[0046]

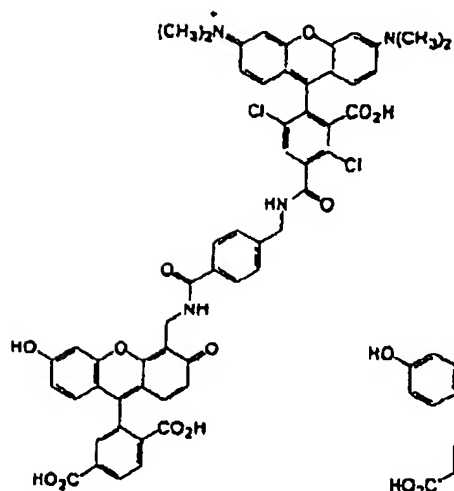
[Formula 39]



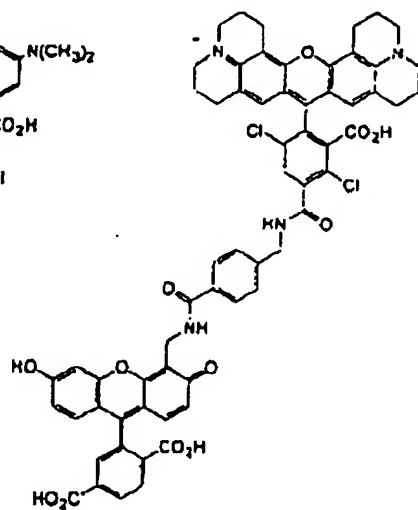
5-CFB-DTMR-2



5-CFB-DROX-2



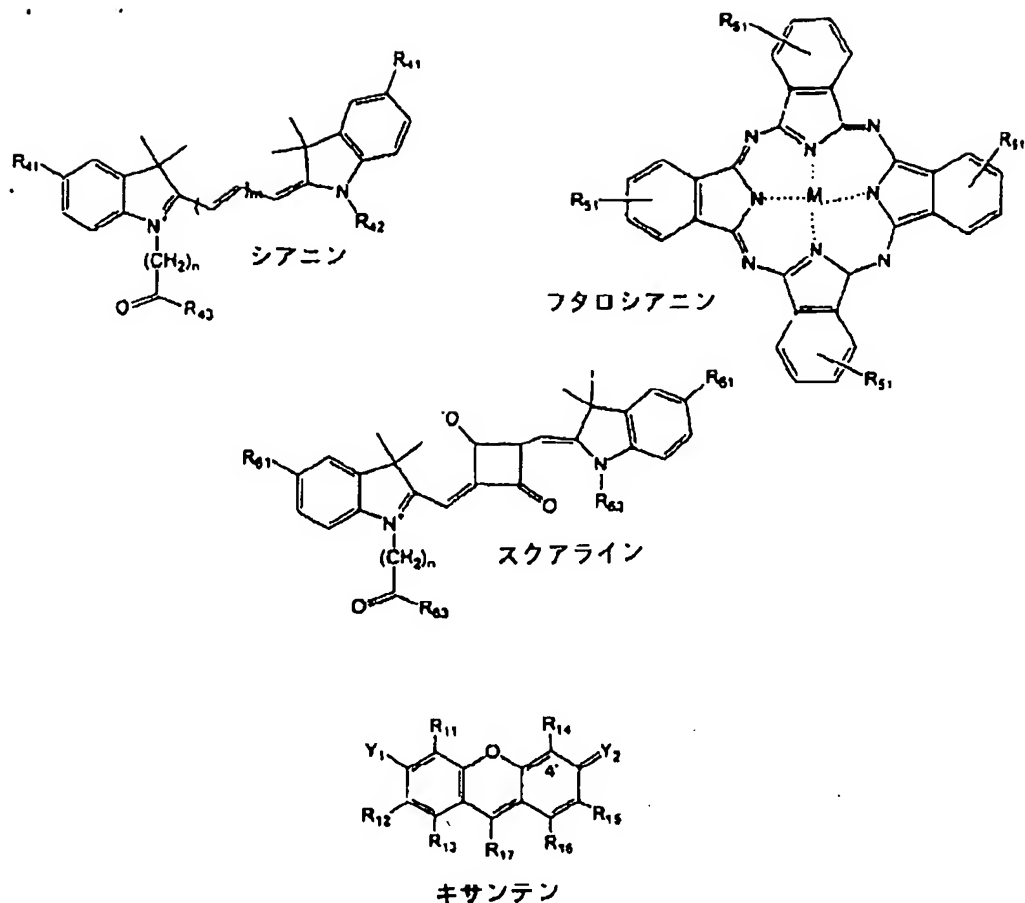
6-CFB-DTMR-2



6-CFB-DROX-2

[0047]

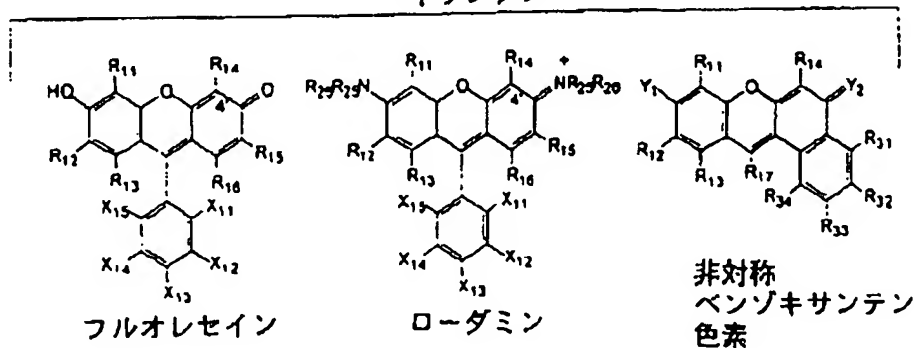
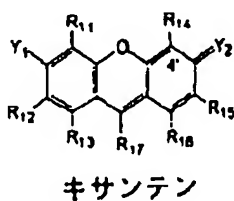
[Formula 40]



[0048]A. The first class, as mentioned above, the first class of the energy transfer coloring matter of this invention is a member of the xanthene class of coloring matter, and contains the donor coloring matter of energy transfer coloring matter which so has xanthene ring structure at least with 4' ring. In this class of coloring matter, an acceptor pigment is coloring matter which absorbs the excitation energy released with donor coloring matter, can answer and can show a fluorescence by secondary wave length. According to this embodiment, a donor may be a member of the fluorescein class of coloring matter, a rhodamine class, or an unsymmetrical benzoxanthene class, and each of these coloring matter is ** of the still larger xanthene class of coloring matter. The general structural formula of these xanthene pigments is shown below. The substituent explained about these coloring matter may be chosen from the substituent of the variety which may be contained in these different classes of coloring matter. It is because it has intention of all the coloring matter which has a general xanthene ring structure, a fluorescein ring structure, a rhodamine ring structure, and unsymmetrical ring benzoxanthene structure entering within the limits of this invention if it becomes what.

[0049]

[Formula 41]



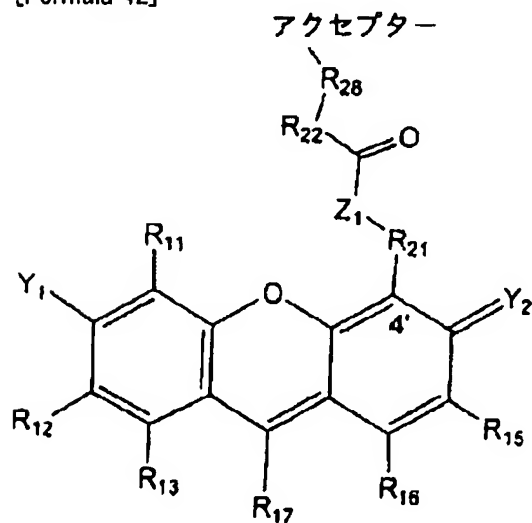
[0050]Although a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter are mentioned

as an example of the class of the acceptor pigment which can be used into the energy transfer fluorochrome of this embodiment, it is not limited to these. The general structural formula of these coloring matter is shown in Table 1A. The substituent these coloring matter was explained to be may be chosen from the substituent of the variety which may be contained in these different classes of coloring matter. It is because it has intention of all the coloring matter which has a general xanthene ring structure, a fluorescein ring structure, a rhodamine ring structure, unsymmetrical benzo xanthene ring structure, a cyanine ring structure, phthalocyanine ring structure, and a squaraine ring structure entering within the limits of this invention if it becomes what. As an example of the donor coloring matter which can be used for this embodiment, fluorescein, The isomer of carboxyfluorescein (for example, 5 carboxy and 6 carboxy), The isomer of carboxy-HEX (for example, 5 carboxy and 6 carboxy), The isomer of NAN, CI-FLAN, TET, JOE, ZOE, a rhodamine, and a carboxy rhodamine. The isomer of (for example, 5 carboxy and 6 carboxy), and the carboxy R110. The isomer of (for example, 5 carboxy and 6 carboxy), and the carboxy R6G. (For example, 5 carboxy and 6 carboxy), 4,7-dichlorofluorescein (refer to U.S. Pat. No. 5,188,934), A 4,7-dichloro rhodamine (1996 refer to U.S. patent application 08th for which it applied on the 27th in June per year / No. 672,196), An unsymmetrical benzo xanthene pigment (refer to U.S. patent application 08th for which it applied on April 1, 1996 / No. 626,085), And although the isomer (for example, 5 carboxy and 6 carboxy) of a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine (TMARA) is mentioned, it is not limited to these.

[0051] As an example of an acceptor pigment which can be used for this working example, an isomer of carboxyfluorescein. (For example, 5 carboxy and 6 carboxy), 4,7-dichlorofluorescein, A 4,7-dichloro rhodamine, fluorescein, an unsymmetrical benzo xanthene pigment, An isomer of carboxy-HEX (for example, 5 carboxy and 6 carboxy), An isomer of NAN, CI-FLAN, TET, JOE, ZOE, a rhodamine, and a carboxy rhodamine. An isomer of (for example, 5 carboxy and 6 carboxy), and the carboxy R110. An isomer of (for example, 5 carboxy and 6 carboxy), and the carboxy R6G. An isomer of a 5 carboxy and (6 carboxy [for example,]) N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine (TMARA). Although an isomer (for example, 5 carboxy and 6 carboxy) of a (5 carboxy and 6 carboxy[for example,]) carboxy-X-rhodamine (ROX) and Cy5 are mentioned, it is not limited to these. A structural formula of these coloring matter is shown in Table 2. In the first class of energy transfer coloring matter of this invention, a linker is combined with donor coloring matter at least by 4' of xanthene ring structure. General structural-formula $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{28}$ as set like 1 operative condition and a linker indicated to be below (among a formula) R_{21} is C_{1-5} alkyl combined at least with 4' ring of a donor xanthene pigment, Z_1 is NH, sulfur, or oxygen, and C(O) is a carbonyl group, a functional group to which R_{22} is a substituent including condensed ring structure combined with a five-membered ring which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond and six membered-rings, or carbonyl carbons, and R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- it is -- it has.

[0052]

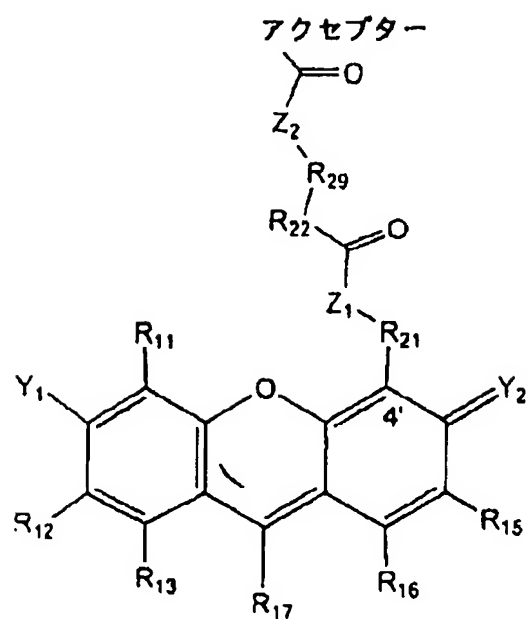
[Formula 42]



[0053] As an example of the five-membered ring which can be used into R_{22} , or six membered-rings, cyclopentene, Although a cyclohexene, a cyclopentadiene, cyclohexadiene, a franc, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN, and oxazine are mentioned, It is not limited to these. Although indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene are mentioned as an example of condensed ring structure, it is not limited to these. As one change of this embodiment is shown below, a linker is general structural-formula $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{29}Z_2C(O)R_{21}$ (among a formula). R_{21} is C_{1-5} alkyl combined at least with 4' ring of the donor xanthene pigment, Z_1 and Z_2 are NH, sulfur, or oxygen independently, respectively, and C(O) is a carbonyl group, R_{22} is a substituent including the condensed ring structure combined with the five-membered ring which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond and six membered-rings, or carbonyl carbons, R_{29} is C_{1-5} alkyl and an end carbonyl group is combined with the ring structure of an acceptor pigment -- **** -- it has.

[0054]

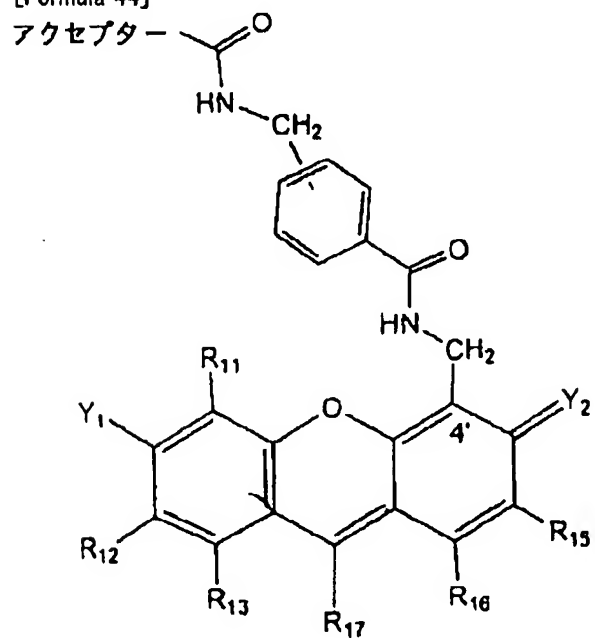
[Formula 43]



[0055] The desirable embodiment of this linker is a case where R_{21} and R_{29} are methylene, and Z_1 and Z_2 are NH(s), and R_{22} is benzene, as shown below.

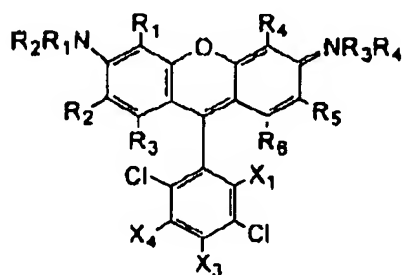
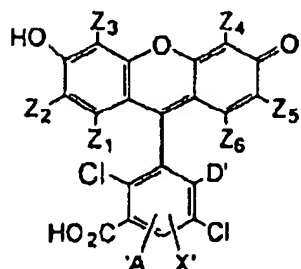
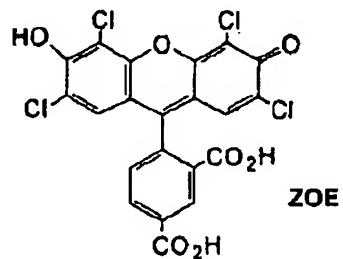
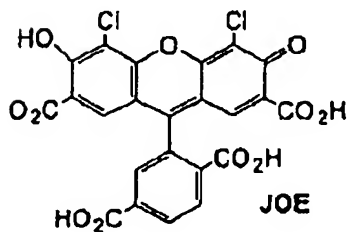
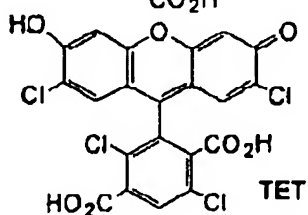
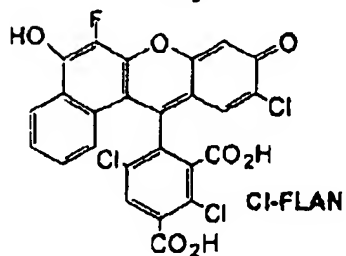
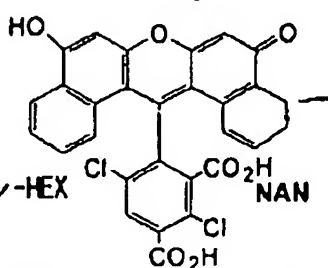
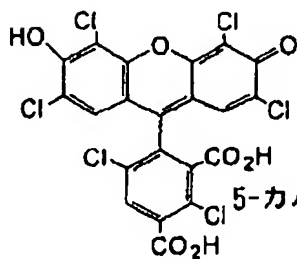
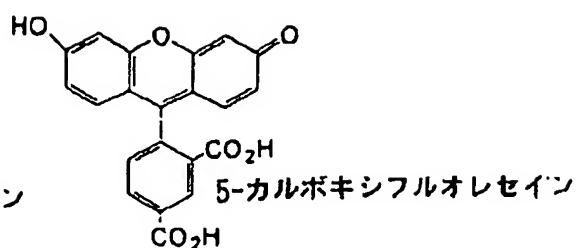
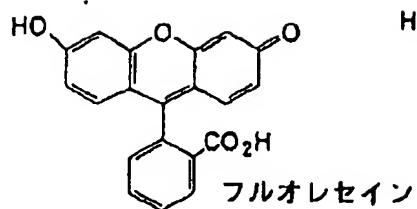
[0056]

[Formula 44]



[0057]

[Formula 45]

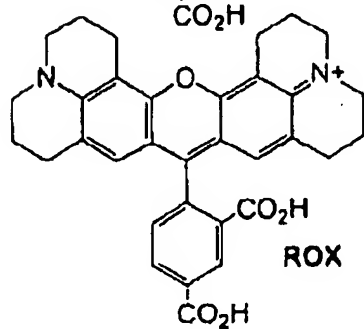
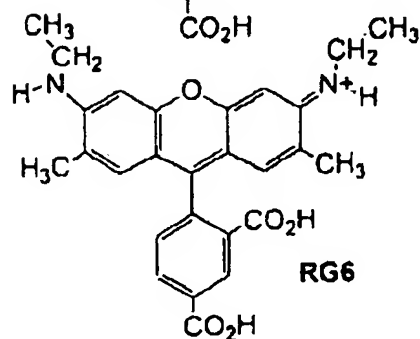
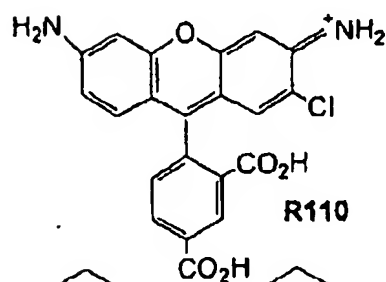
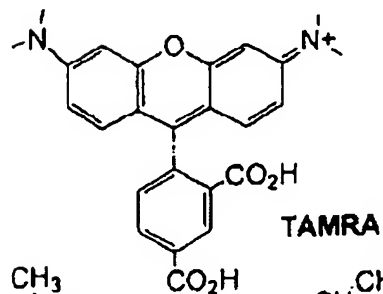
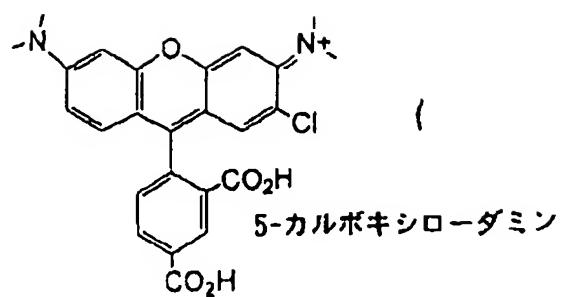
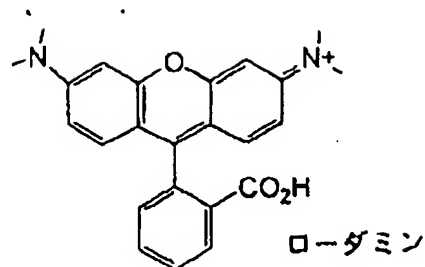


4,7 ジクロロフルオレsein
(米国特許第5,188,934 号を参照
のこと)

4,7ジクロロローダミン

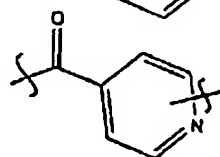
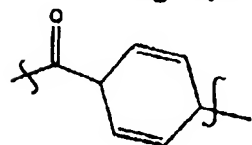
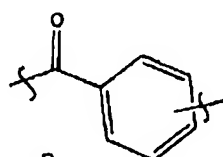
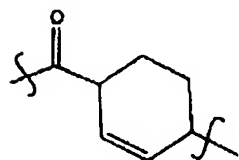
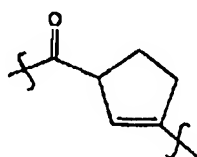
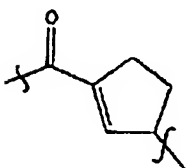
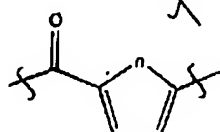
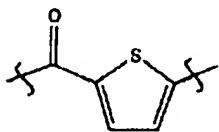
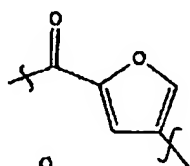
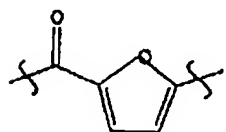
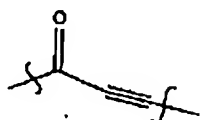
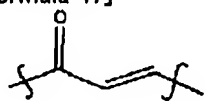
[0058]

[Formula 46]

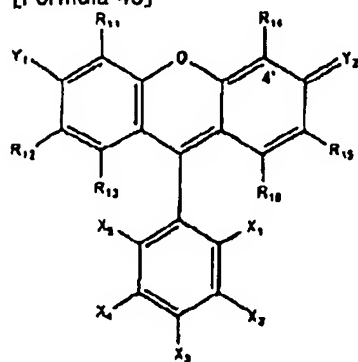


[0059]

[Formula 47]



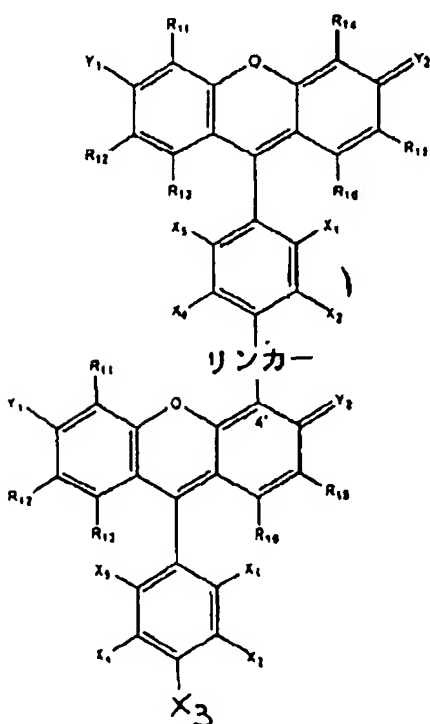
[0060] As shown in working example 4 and drawing 2, the energy transfer coloring matter like 5-TMR-B-CF containing a donor, an acceptor, and a linker which were specified previously, The fluorescence reinforced compared with the energy transfer fluorochrome which has the same donor acceptor pair in case the linkers between acceptor itself and donor acceptor pairs differ is shown. It is thought that the observed fluorescence strength which was reinforced is for the improved energy transfer orientation between the donor coloring matter and the acceptor pigment which are obtained by the comparatively hard R₂₂ portion of a linker, and are maintained without being bound by theory. As the result, the energy transfer fluorochrome of this invention shows the fluorescence strength reinforced compared with the energy transfer fluorochrome which has the same donor acceptor pair in case the linkers between acceptor fluorescent substance itself and donor acceptor pairs differ. the fluorescence strength by which these coloring matter was reinforced is clear especially under existence of 8M urea which can use coloring matter stacking for falling. In one change of this embodiment, an acceptor is a general structural formula. [0061] [Formula 48]



[0062] He is a member of the xanthene class of coloring matter who has (the inside of a formula, Y₁, Y₂, R₁₁-R₁₆ and X₁ - X₅ are as having been specified previously). As for the linker like the above-mentioned linker, according to this change, it is preferred to be combined with an acceptor xanthene pigment via X₃ of an acceptor xanthene pigment or a X₄ substituent. A linker is combined with the X₃ substituent of an acceptor xanthene pigment in a desirable embodiment as shown below.

[0063]

[Formula 49]



アクセプター

リンカー

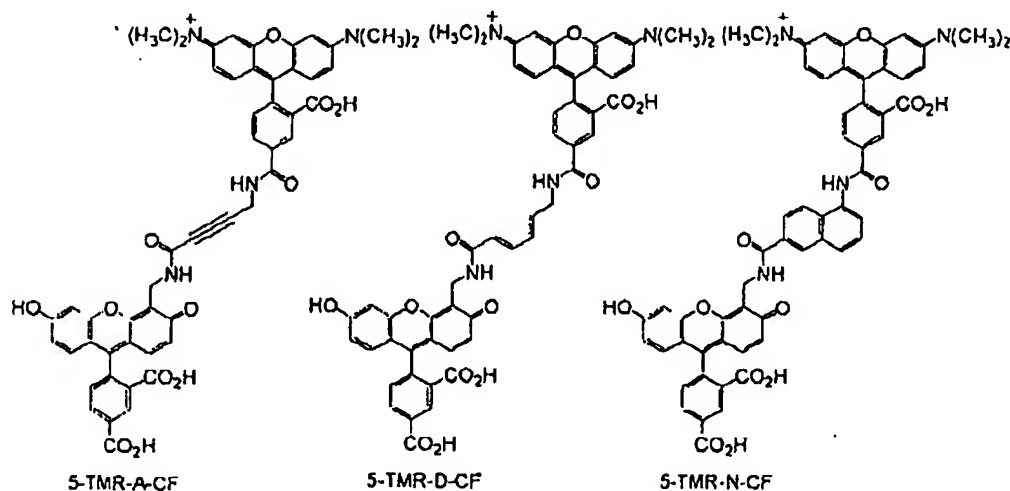
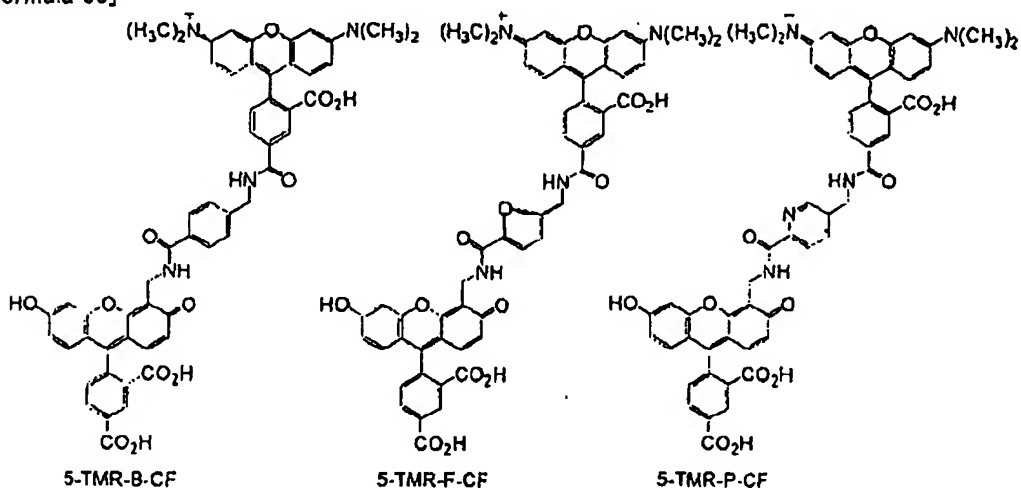
ドナー

[0064] Table 4 shows the example of the above-mentioned energy transfer coloring matter of this embodiment of this invention. Although the coloring matter shown all over Table 4 contains 5-carboxyfluorescein donor coloring matter and a TAMRA acceptor pigment, it attracts attention that it should be understood that the xanthene pigment of various others can replace easily as donor coloring matter. It should be understood that it replaces with the

TAMRA acceptor pigment in which various other xanthene pigments and cyanine dye, phthalocyanine dye, and Aqua-Line coloring matter were described above, and can replace easily, These the change of all about donor coloring matter and an acceptor pigment enters within the limits of this invention.

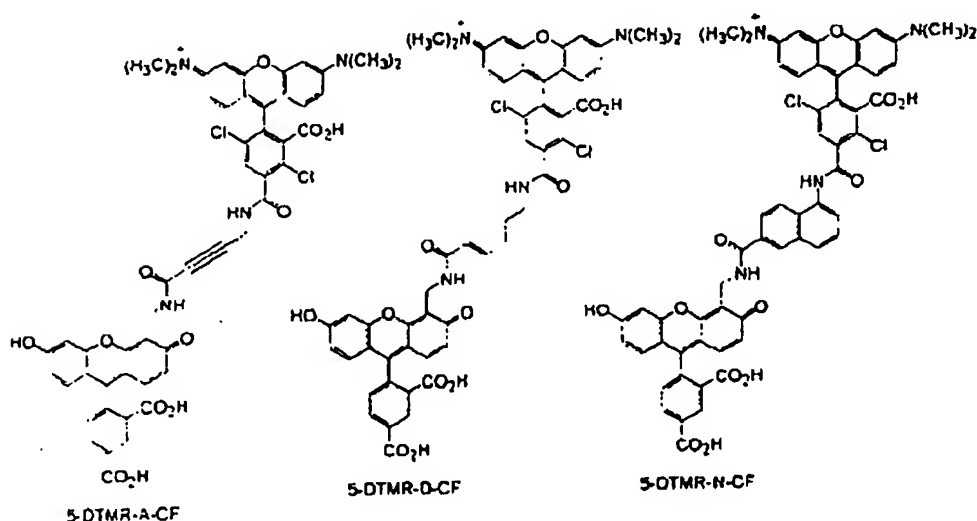
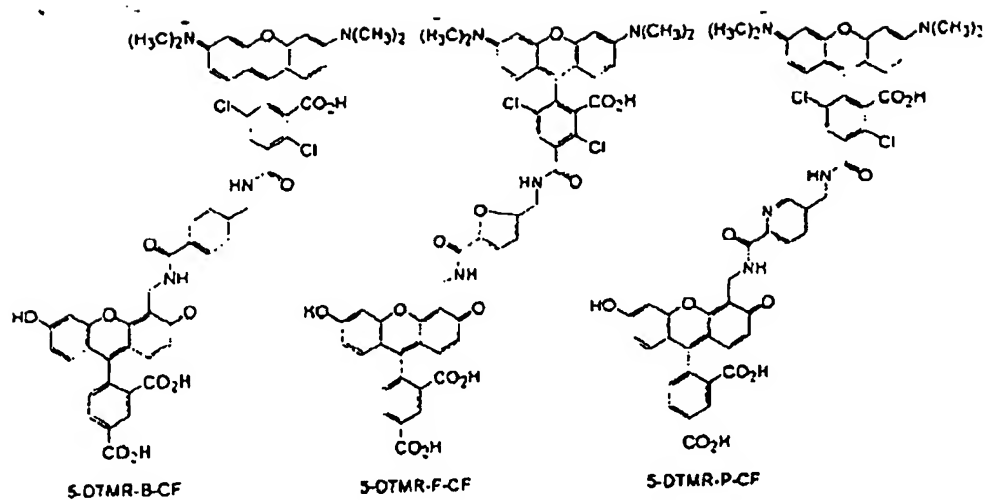
[0065]

[Formula 50]



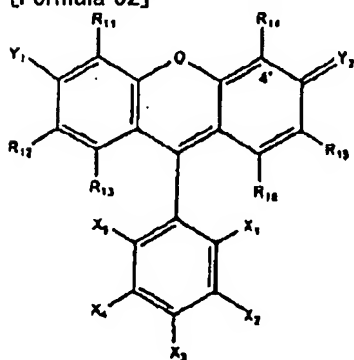
[0066]

[Formula 51]



[0067]B. As for second class this invention of energy transfer coloring matter, donor coloring matter and an acceptor pigment are general structural formulae again. [0068]

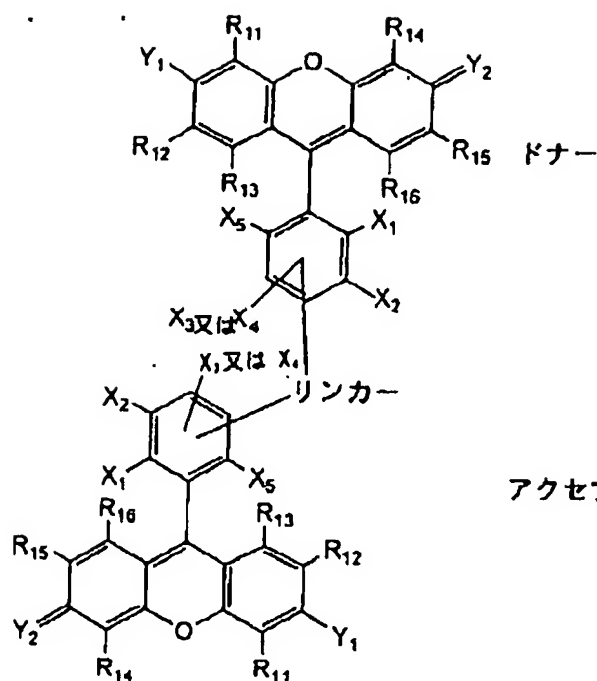
[Formula 52]



[0069]It is related with the second class of an energy transfer fluorochrome as shown below that is ** of the xanthene class of coloring matter which has (the inside of a formula, Y_1 , Y_2 , R_{11} - R_{16} and X_1 - X_5 are as having been specified previously). According to this embodiment, a linker is combined with X_3 of both donor coloring matter and an acceptor pigment, or a X_4 substituent as shown below.

[0070]

[Formula 53]

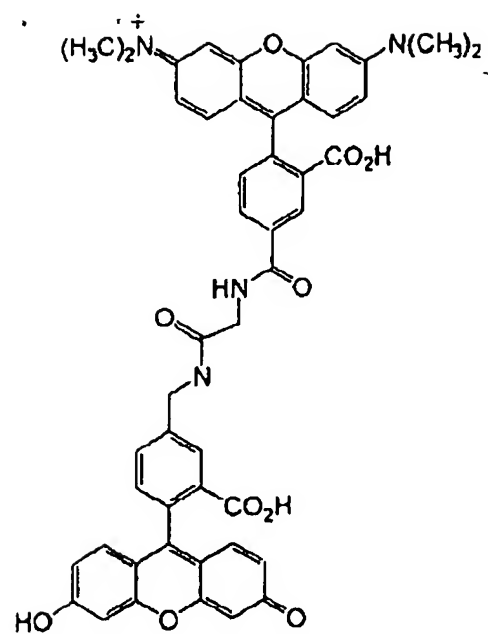


[0071] In this embodiment, a linker is short and it is preferred that it is/or hard. It is because it turned out that this increases transition of the energy between donor coloring matter and an acceptor pigment when becoming what. For example, as for a linker, in one change of this embodiment, it is preferred to have a main chain with which length combines with an acceptor the donor who is less than nine atoms. In another change of this embodiment, a linker includes the functional group which gives the rigidity on the structure of a certain grade to a linker, for example, an alkene, diene, an alkyne, the five-membered ring that has at least one unsaturated bond and six membered-rings, or condensed ring structure. furthermore -- in another change -- a linker -- general formula $R_{25}Z_3C(O)$ or $R_{25}Z_3C(O)R_{26}Z_4C(O)$ (among a formula) R_{25} is combined with donor coloring matter, and $C(O)$ is a carbonyl group, the end carbonyl group is combined with the acceptor pigment, and R_{25} and R_{26} are chosen from the group of C_{1-4} alkyl, respectively -- and Z_3 and Z_4 -- respectively -- independent -- NH , O , or S -- it is -- it has. As an example of the donor coloring matter and the acceptor pigment which can be used for this embodiment, Fluorescein, 5 or 6 carboxyfluorescein, 5, or 6 carboxy-HEX, NAN, CI-FLAN, TET, JOE, ZOE, 4,7-dichlorofluorescein, An unsymmetrical benzo xanthene pigment, a rhodamine, 5, or 6 carboxy rhodamine, Although a 5 or 6 carboxy- R110, 5, or 6 carboxy- R6G, N,N,N',N'-tetramethyl (5 or 6)-carboxy rhodamine (TAMRA), 5, or 6 carboxy-X-rhodamine (ROX) and a 4,7-dichloro rhodamine are mentioned, It is not limited to these. The structural formula of these coloring matter is shown in Table 2.

[0072] In another change of this embodiment, a linker is an $R_{27}Z_5C(O)$ group (among a formula). a carbonyl group by which R_{27} is the C_{1-5} alkyl combined with donor coloring matter, and Z_5 is NH , sulfur, or oxygen, and $C(O)$ was combined with an acceptor pigment -- it is -- it contains. Table 5 shows an example of the second class of energy transfer coloring matter of this invention. Although coloring matter shown in Table 5 contains 5-aminomethyl fluorescein donor coloring matter, it attracts attention that it should be understood that a xanthene pigment of various others can replace easily as donor coloring matter. It should be understood that it replaces with a TAMRA acceptor pigment in which various other xanthene pigments and cyanine dye, phthalocyanine dye, and Aqua-Line coloring matter were described above, and can replace easily. These the change of all about donor coloring matter and an acceptor pigment enters within the limits of this invention.

[0073]

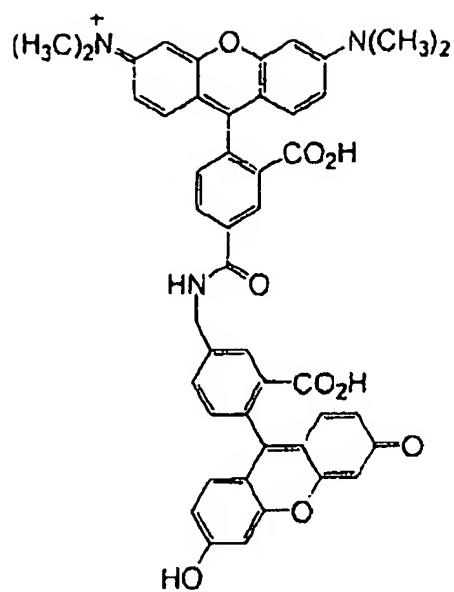
[Formula 54]



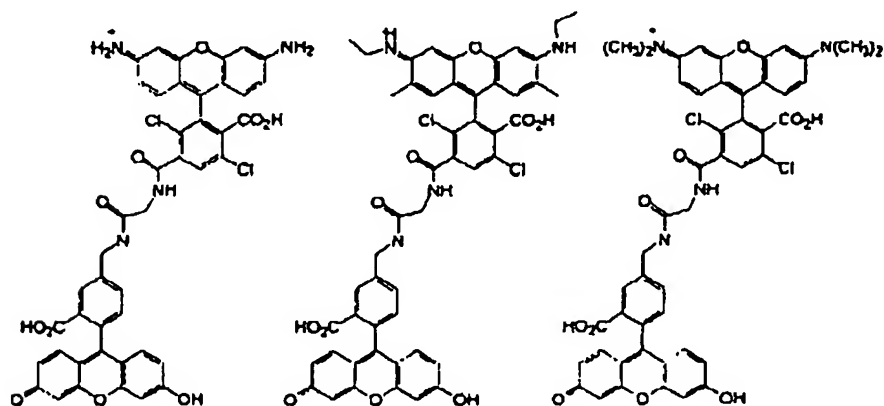
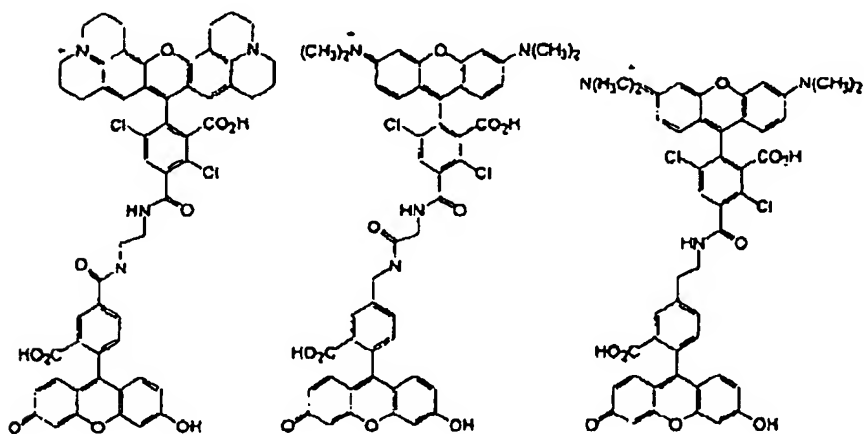
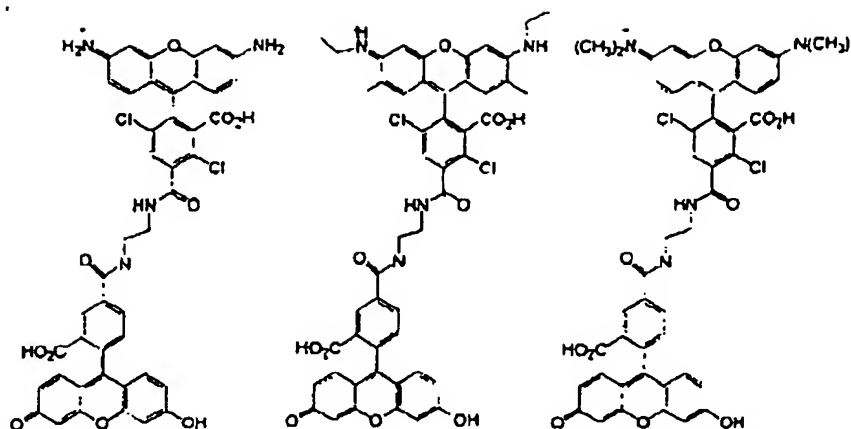
5TMR-gly-5AMF

[0074]

[Formula 55]

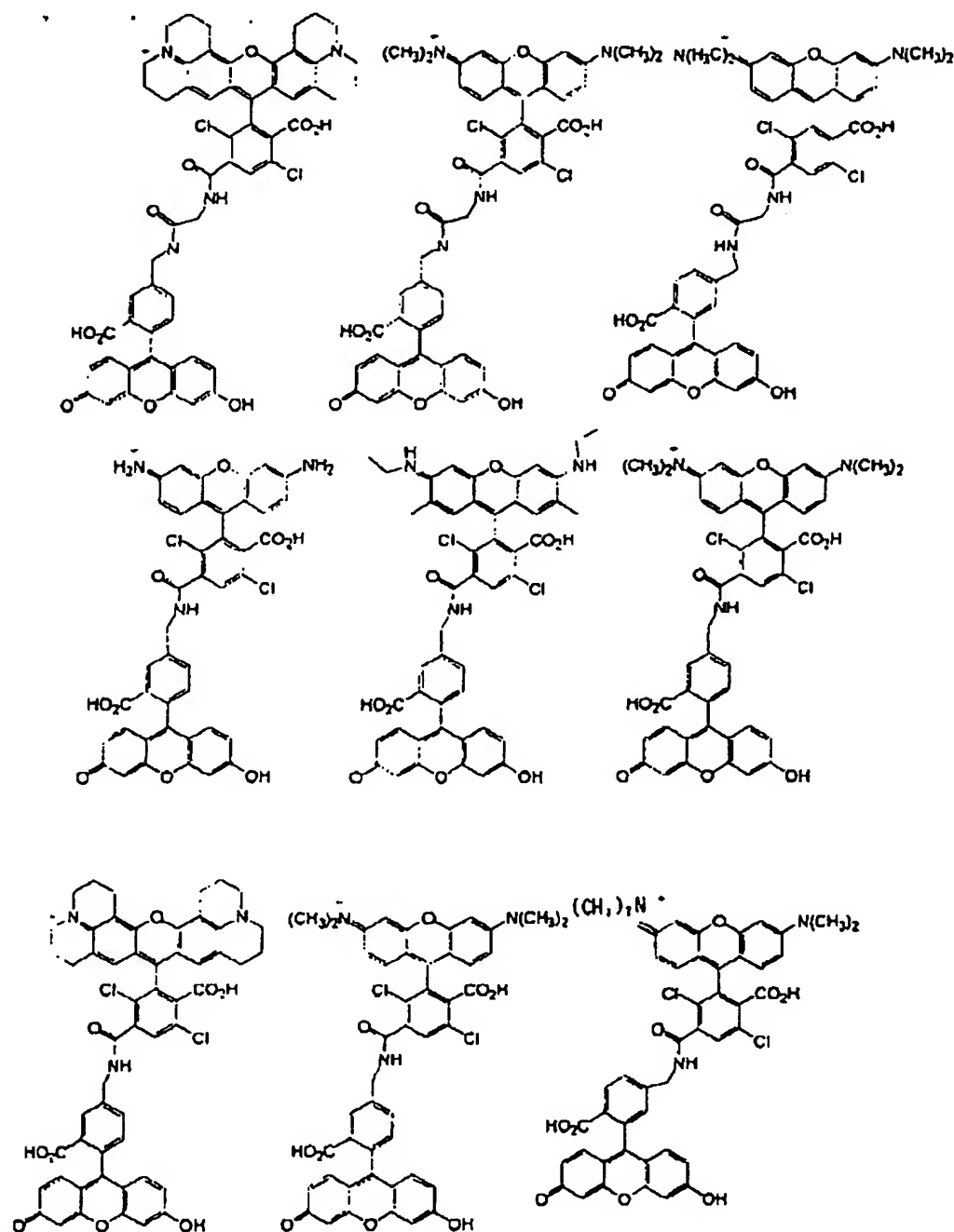


5TMR-5AMF



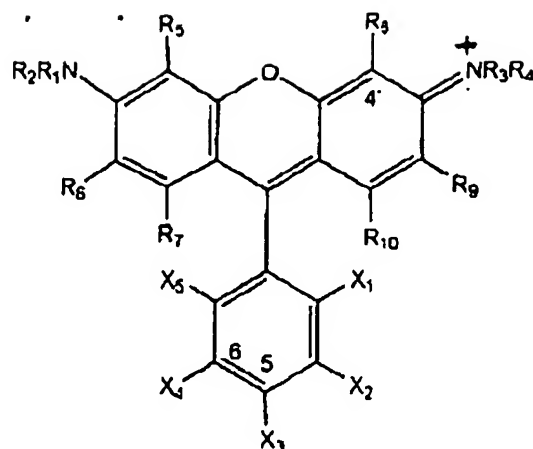
[0075]

[Formula 56]



[0076]C. The third class of the third class energy transfer fluorochrome of energy transfer coloring matter contains the coloring matter which produces the discharge which can absorb the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter as the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter and donor coloring matter as an acceptor pigment. These coloring matter shows the fluorescence strength reinforced compared with an acceptor pigment independent. In addition, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter shows an emission spectrum narrower than other rhodamine coloring matter, and this promotes those use in a multicomponent analysis. In a desirable embodiment, the acceptor of these energy transfer coloring matter is 4,7-dichloro rhodamine coloring matter in this case including coloring matter given in the first class and the second class of coloring matter.

A 1,4,7-dichloro rhodamine coloring matter 4,7-dichloro rhodamine pigment compound is a general structural formula. [0077]
[Formula 57]



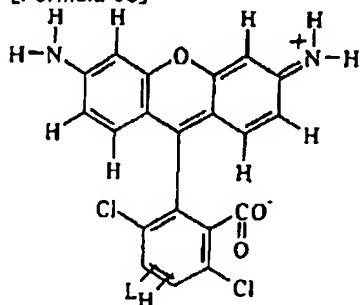
[0078]It ****. Independently $R_1 - R_4$ among a formula, respectively Hydrogen, alkyl, or R_1 and R_5 , When R_2 , R_6 and R_3 , R_8 and R_4 , and R_9 are mixed and form a ring, Are such combination and independently $R_5 - R_{10}$, respectively And hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, An alkyne, sulfonate, a sulfone, amino ** ammonium, amide, When nitril, alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, or a contiguity substituent is mixed and forms a ring, Are such combination and independently X_1 , X_3 , and X_4 , respectively And hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, When alkyne, sulfonate, sulfone, amino ** ammonium, amide, nitril, or alkoxy ** or a contiguity substituent is mixed and forms a ring, it is such combination and X_2 and X_5 are chlorine.

[0079]Coloring matter which enters into a 4,7-dichloro rhodamine class of coloring matter, and those composition are indicated to U.S. patent application 08th for which it applied on June 27, 1996 of the Title of invention "4,7-dichloro rhodamine coloring matter" / No. 672,196, and the patent is included in this Description as reference. Alkyl substituent may also contain about 1-8 carbon atoms about $R_1 - R_4$. They may be (namely, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, tert-butyl, isobutyl, sec-butyl, neopentyl one, tert-pentyl, etc.), straight chain hydrocarbon portions, and a branching hydrocarbon portion. In a desirable embodiment, $R_1 - R_4$ are hydrogen, methyl, or ethyl independently, respectively, and are hydrogen or methyl still more preferably. About $R_5 - R_{10}$, alkyl substituent, an alkene substitution group, An alkyne substitution group and an alkoxy substituent may also contain about 1-8 carbon atoms preferably. They may be (namely, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, tert-butyl, isobutyl, sec-butyl, neopentyl one, tert-pentyl, etc.), straight chain hydrocarbon portions, and a branching hydrocarbon portion. About $R_1 - R_{10}$, R_1 , R_5 and R_2 , R_6 and R_3 , R_8 and R_4 , and R_9 are mixed respectively independently, and may form a five-membered ring, six membered-rings, or seven membered-rings.

[0080]Setting like 1 operative condition, as for R_6 and R_7 , those with benzo ** and/or R_9 , and R_{10} are benzo *****. In a desirable embodiment, $R_5 - R_{10}$ are hydrogen, methyl, or ethyl independently, respectively, and are hydrogen or methyl still more preferably. X_1 is carboxylate preferably about X_1 , X_3 , and X_4 . And one of X_3 and the X_4 may contain a substituent used for combining a 4,7-dichloro rhodamine acceptor pigment with donor coloring matter, or combining a nucleotide or an oligonucleotide with energy transfer coloring matter. It can be used for an R_8 substituent only in 4' ring combining an acceptor with a living thing molecule like donor coloring matter, a nucleotide, or an oligonucleotide again. In one especially desirable acceptor pigment which is called DR110 in this Description-2 and which can be used for this invention, $R_1 - R_{10}$ are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups (L), and another side is hydrogen. Structure of DR110-2 is shown below.

[0081]

[Formula 58]



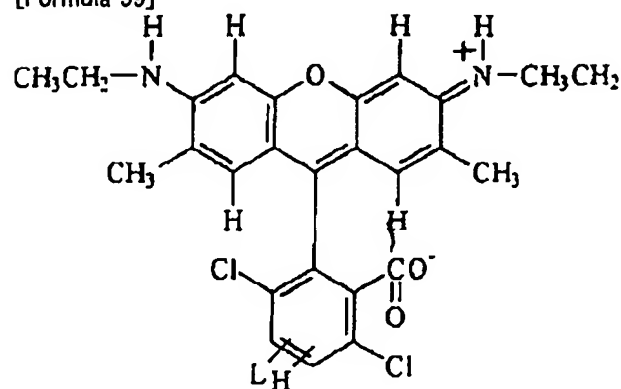
DR110-2

[0082]In the second especially desirable acceptor pigment that is called DR6G in this Description-2 and that can be

used for this invention, Either R_1 or R_2 is ethyl, another side is hydrogen, and either R_3 or R_4 is ethyl, Another side is hydrogen, R_5 and R_8 are made separate, and are methyl, R_6 , R_7 , R_9 , and R_{10} are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. The structure of DR6G-2 is shown below.

[0083]

[Formula 59]

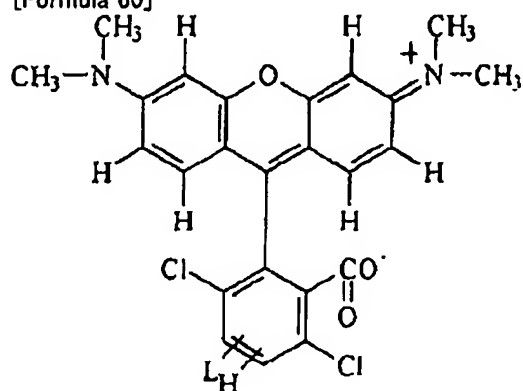


DR6G-2

[0084]In the third especially desirable acceptor pigment that is called the inside DTMR of this Description and that can be used for this invention, $R_1 - R_6$ are made separate, and are hydrogen, $Y_1 - Y_4$ are made separate, and are methyl, X_1 is carboxylate, either X_2 or X_3 is bond groups, and another side is hydrogen. Structure of DTMR is shown below.

[0085]

[Formula 60]

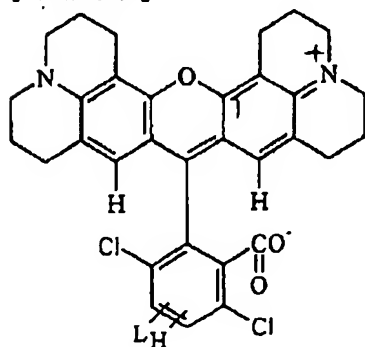


DTMR

[0086]In the fourth especially desirable acceptor pigment that is called the inside DROX of this Description and that can be used for this invention, R_1 and R_6 are mixed and form six membered-rings, and R_2 and R_5 are mixed and form six membered-rings, R_3 and R_7 are mixed and form six membered-rings, R_4 and R_8 are mixed, and form six membered-rings, R_5 and R_8 are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. The structure of DROX is shown below.

[0087]

[Formula 61]

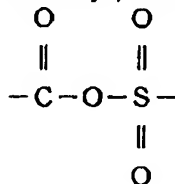


DROX

[0088]Drawing 3 A and 3B show some additional desirable embodiments of the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter which can be used into the energy transfer coloring matter of this invention. In the compound 3a, either R_1 or R_2 is ethyl, Another side is hydrogen, R_3 and R_4 are made separate, and are hydrogen, R_5 is methyl, $R_6 - R_{10}$ are

made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 3b, either R_1 or R_2 is ethyl, Another side is hydrogen, R_3 and R_4 are made separate, and are methyl, R_5 is methyl, $R_6 - R_{10}$ are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 3c, R_1 and R_2 are made separate, and it is methyl, R_3 and R_7 are mixed and form six membered-rings, and R_4 and R_8 are mixed and form six membered-rings, R_5 , R_6 , R_9 , and R_{10} are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 3d, R_1 and R_2 are made separate, and it is hydrogen, R_3 and R_7 are mixed and form six membered-rings, and R_4 and R_8 are mixed and form six membered-rings, R_5 , R_6 , R_9 , and R_{10} are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 3e, either R_1 or R_2 is ethyl, Another side is hydrogen, and R_3 and R_7 are mixed and form six membered-rings, R_4 and R_8 are mixed, and form six membered-rings, R_5 is methyl, R_6 , R_9 , and R_{10} are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 3f, R_1 and R_2 are made separate, and it is hydrogen, R_3 and R_4 are made separate, and are methyl, $R_5 - R_{10}$ are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen.

[0089] Drawing 5 and 6 show a generalized desirable synthetic scheme of preparation of 4,7-dichloro rhodamine coloring matter used into energy transfer coloring matter of this invention. A variable substituent shown in each figure is as having defined previously. Drawing 5 shows generalized composition which substituent X_1 is except carboxylate, and obtains. X' shows among a figure a portion which is a precursor of X_1 . In a method shown in drawing 5, the 2-Eq 3-aminophenol derivatives 4a/4b, for example, 3-dimethylamino phenol -- the 1-Eq dichlorobenzene derivative 4c 3, for example, 4-carboxy-, and a 6 dichloro-2-sulfobenzonic acid cyclic anhydride



(namely, -- a X_1' portion of 4c is mixed)

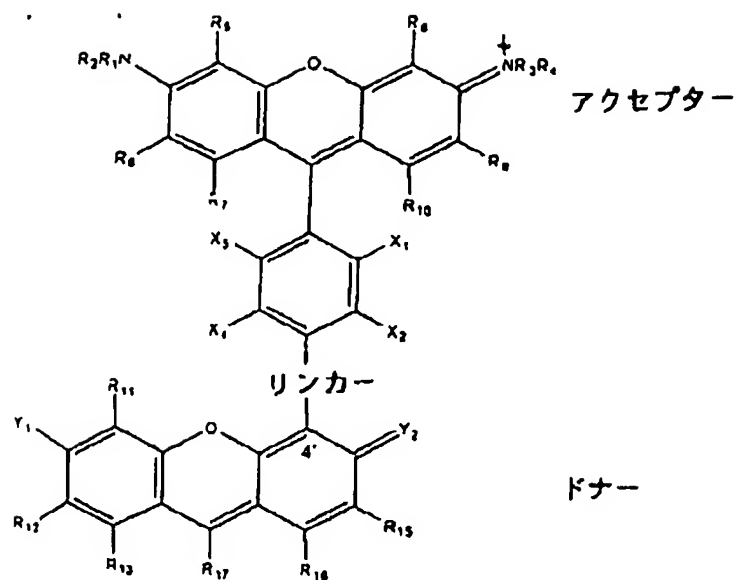
You are made to react coming out.

[0090] Subsequently, reagin is heated by 180 ** in strong acid, for example, polyphosphoric acid, or sulfuric acid for 12 hours. The rough coloring matter 4d precipitates by addition to water, and isolates by centrifugal separation. In order to generate symmetrical output, a substituent of the reagins 4a and 4b is the same, but in order to generate unsymmetrical output, substituents differ. Drawing 6 shows generalized composition whose substituent X_1 is carboxylate. The 2-Eq 3-aminophenol derivatives 4a/4b, for example, 3-dimethylamino phenol, are made to react to the 1-Eq phthalic anhydride derivative 4e, for example, 3,6-dichloro trimellitic anhydride, in a method of drawing 6. Subsequently, reagin is heated by 180 ** in strong acid, for example, polyphosphoric acid, or sulfuric acid for 12 hours. The rough coloring matter 4d precipitates by addition to water, and isolates by centrifugal separation. In order to generate symmetrical output, a substituent of the reagins 4a and 4b is the same, but in order to generate unsymmetrical output, substituents differ.

2. To the general energy transfer coloring matter containing a 4,7-dichloro rhodamine as an acceptor. Donor coloring matter which energy transfer coloring matter of this invention absorbs light of the first wave, and answers and releases excitation energy, A linker which forms in an acceptor pigment a 4,7-dichloro rhodamine acceptor pigment which absorbs excitation energy released with donor coloring matter, can answer and can show a fluorescence of secondary wave length, and donor coloring matter is included. A desirable example of this class of coloring matter which uses 4,7-dichloro rhodamine coloring matter as an acceptor pigment is shown in Table 1. Although coloring matter shown in DR110-2 which was explained previously, DR6G-2, DTMR, DROX, drawing 3, and 4 as an example of an acceptor pigment which can be used into this class of coloring matter is mentioned, it is not limited to these. One subclass of these energy transfer fluorochromes is coloring matter of the first class of coloring matter of this invention whose acceptor pigment is 4,7-dichloro rhodamine coloring matter. A general structural formula of these coloring matter is shown below.

[0091]

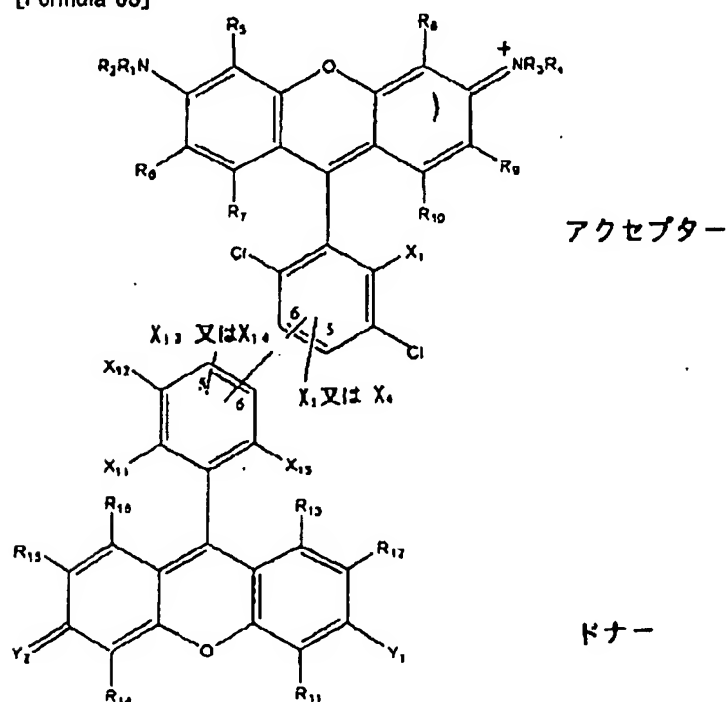
[Formula 62]



[0092] Table 4 shows the example of the energy transfer coloring matter in which a 4,7-dichloro rhodamine belongs to the first class of the coloring matter used as an acceptor pigment. Although the coloring matter shown in Table 4 contains 5 or the 6 carboxy DTMR as 5-carboxyfluorescein donor coloring matter and an acceptor pigment, The xanthene pigment of various others can replace easily as donor coloring matter, It attracts attention that it should be understood that the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter of various others replaces with a DTMR acceptor pigment, and can replace easily, and it has intention of these the change of all about donor coloring matter and an acceptor pigment entering within the limits of this invention. Another subclass of these energy transfer fluorochromes is coloring matter of the second class of the coloring matter of this invention whose acceptor pigment is 4,7-dichloro rhodamine coloring matter. The general structural formula of these coloring matter in which a donor xanthene pigment and acceptor 4,7-dichloro rhodamine coloring matter of each other are combined at least for five rings of donor coloring matter and an acceptor pigment with about 6 rings is shown below.

[0093]

[Formula 63]



[0094] As mentioned above, in this embodiment, the linker which combines a donor with an acceptor pigment is short, and it is preferred that it is/or hard. It is because it turned out that this increases transition of the energy between donor coloring matter and an acceptor pigment when becoming what. The same group of the substituent specified about other coloring matter deserves the substituent label shown previously. Table 5 shows the example of the second class of the energy transfer coloring matter of this invention in which a 4,7-dichloro rhodamine is used as an acceptor pigment. Although the coloring matter shown in Table 5 contains 5-aminomethyl fluorescein donor coloring matter, it attracts attention that it should be understood that the xanthene pigment of various others can replace easily as donor coloring matter. It should be understood that the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter of

various others replaces with the coloring matter shown in Table 5, and can replace easily. It is because it has intention of these the change of all about donor coloring matter and an acceptor pigment entering within the limits of this invention as described above if it becomes what.

D. Donor coloring matter of fourth class this invention of energy transfer coloring matter is a member of a xanthene class of coloring matter again, And an acceptor pigment is related with the fourth class of an energy transfer fluorochrome which is a member of a xanthene class of coloring matter, a cyanine class, a phthalocyanine class, or a squaraine class. In this class of energy transfer coloring matter, a donor is a member of a fluorescein class of coloring matter, and it is preferred to have the luminescence maximum larger at least about 100 nm than the luminescence maximum with a larger acceptor pigment than about 600 nm and/or the absorbance maximum of donor coloring matter.

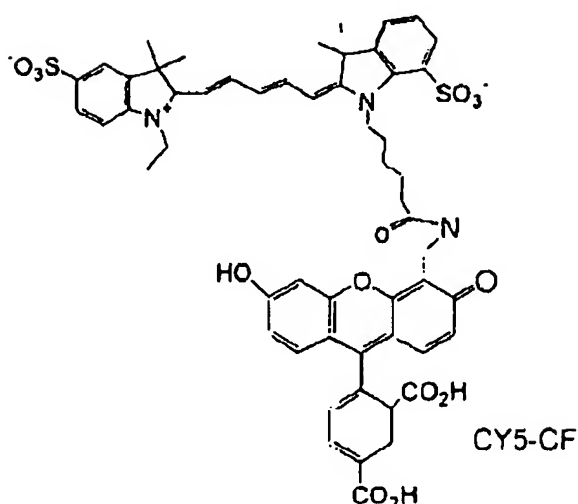
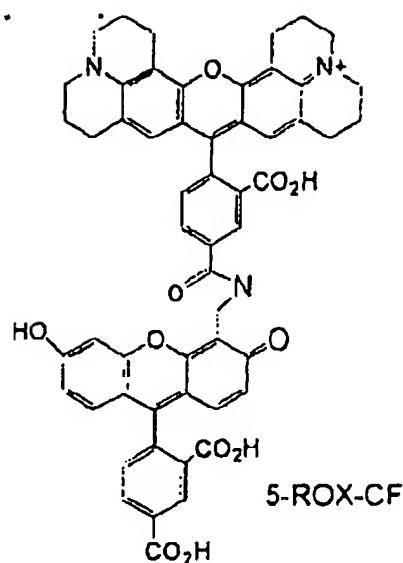
[0095]The fourth class of coloring matter of this invention is measured according to a donor's absorbance and a difference of luminescence of an acceptor, and usually shows the large Stoke shift. In addition, these coloring matter shows effective energy transfer with a point that the minimum donor fluorescence is observed. Though an absorption spectrum of an acceptor pigment does not lap with an emission spectrum of donor coloring matter, in some of coloring matter belonging to this class, energy is transferred from a donor by important thing at an acceptor. Although a 5-carboxy-X-rhodamine (ROX) and Cy5 are mentioned as an example of an acceptor pigment which can be used for this embodiment, it is not limited to these. Energy transfer coloring matter of this embodiment contains a linker which combines a donor with an acceptor again. Linkers used for combining a donor with an acceptor pigment may be all linkers of the first class of coloring matter, and the second class. However, it is foreknown that another linker may be used into this class of coloring matter.

[0096]This class of coloring matter sets like 1 operative condition, and a linker is combined at least with 4' of xanthene ring structure of donor coloring matter. General structural-formula $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{28}$ of the above [a linker] (among a formula) R_{21} is C_{1-5} alkyl combined at least with 4' ring of a donor xanthene pigment, Z_1 is NH, sulfur, or oxygen, and C (O) is a carbonyl group, R_{22} is a substituent including condensed ring structure combined with a five-membered ring which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond and six membered-rings, or carbonyl carbons, and a functional group to which R_{28} combines a linker with an acceptor pigment -- it is -- having is preferred. As for a linker, when an acceptor pigment is a member of a xanthene class of coloring matter, it is preferred to be combined with an acceptor by the 5th place of xanthene ring structure. Table 6 shows an example of the above-mentioned energy transfer coloring matter of this invention. Although coloring matter shown in Table 6 contains 5-carboxyfluorescein donor coloring matter, it attracts attention that it should be understood that a xanthene pigment of various others can replace easily as donor coloring matter. It should be understood that it replaces with the 5-carboxy ROX and Cy5 acceptor pigment in which various other xanthene pigments and cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter were described above, and can replace easily. These the change of all about donor coloring matter and an acceptor pigment enters within the limits of this invention. Energy transfer coloring matter of this embodiment usually shows the large Stoke shift these coloring matter is made suitable [shift] for use with coloring matter which has the small Stoke shift in 4 coloring-matter DNA sequence determination especially well. For example, drawing 7 and 8 show mutually 2 sets of four coloring matter which can be disassembled in spectrum. 5 ROX-CF is coloring matter which enters within the limits of the fourth class of the above-mentioned coloring matter among drawing 7. On the other hand, drawing 8 contains 5 ROX-CF and Cy5-CF by which both enter within the limits of the fourth class of the above-mentioned coloring matter.

[0097]Very small fluorescence from donor coloring matter (5-carboxyfluorescein, 520 nm) is observed in these coloring matter so that an emission spectrum of 5 ROX-CF shown in drawing 8 and Cy5-CF may show. This is the result of not expecting in view of a big difference of the luminescence maximum of donor coloring matter (fluorescein), and the absorbance maximum of an acceptor pigment (ROX, 590 nm, Cy5, 640 nm).

[0098]

[Formula 64]



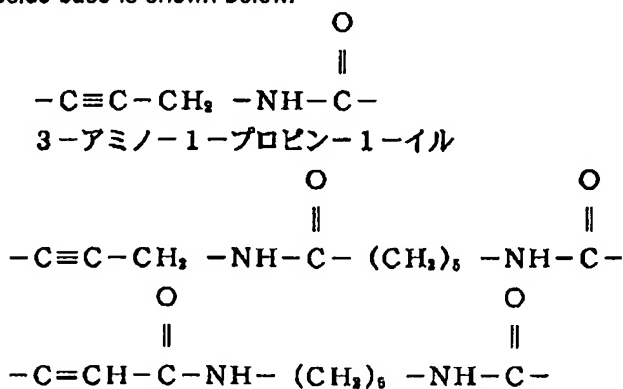
[0099]II. The reagent containing the energy transfer coloring matter of this invention and this invention relate to the fluorescence reagent containing the energy transfer fluorochrome of this invention. These reagents can be used for the method of the variety for detecting existence of the ingredient in a sample so that it may be indicated in detail in Section III. The energy transfer coloring matter of this invention is combined, and the fluorescence reagent of this invention contains all the molecules or substances that can be used for detecting existence of a reagent based on the fluorescence of energy transfer coloring matter. As a mold of the molecule which can be combined with the coloring matter of this invention generating a reagent, and a substance, Protein, polypeptide, a polysaccharide, a nucleotide, a nucleoside, an oligonucleotide, an oligonucleotide analog (for example, peptide nucleic acid), lipid, a solid support, organic polymer, inorganic polymer, and such combination — and, although it crowds round, for example, a chromosome, a core, a viable cell, for example, bacteria, other microorganisms, a mammalian cell, and tissue are mentioned, It is not limited to these. The desirable classes of the reagent of this invention are a nucleotide, a nucleoside, an oligonucleotide, and an oligonucleotide analog (these were embellished so that the energy transfer coloring matter of this invention might be included). The oligonucleotide sign generated by enzyme composition as an example of the use about a nucleotide reagent and a nucleoside reagent, For example, although the nucleoside triphosphate used in the situation of PCR amplification, the Sanger type oligonucleotide sequencing, and a nick translation reaction are mentioned, it is not limited to these. Although the use as a DNA sequence determination primer, a PCR primer, an oligonucleotide hybridization probe, etc. is mentioned as an example of the use about an oligonucleotide reagent, it is not limited to these.

[0100]One special embodiment of a reagent is cytosine, adenosine, guanosine, and thymidine by which the sign was carried out by a nucleoside by which the sign was carried out (NTP), for example, an energy transfer fluorochrome of this invention. These reagents can be used for a method of a variety accompanied by oligonucleotide synthesis. Another related embodiments are a nucleotide by which the sign was carried out, for example, mono-, di-, and triphosphate nucleoside-phosphate ester. . As these reagents, the sign was especially carried out by an energy transfer fluorochrome of this invention. Guanine deoxyriboside triphosphate (dNTP), for example, deoxy cytosine triphosphate, deoxyadenosine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, and deoxythymidine triphosphate are mentioned. In preparation of an oligonucleotide by which the coloring matter sign was carried out, these reagents

can be used as a polymerase substrate, for example. The sign was carried out by an energy transfer fluorochrome of this invention as these reagents. Dideoxy nucleoside triphosphate (ddNTP), for example, dideoxy cytosine triphosphate, dideoxy adenosine triphosphate, dideoxy guanosine triphosphate, and dideoxy thymidine triphosphate are mentioned. These reagents are applicable to coloring matter termination sequence determination, for example. [0101] Another embodiment of a reagent is an oligonucleotide containing an energy transfer fluorochrome of this invention. These reagents can be used for coloring matter primer sequencing, for example. A "nucleoside" used for this Description, . For example, were combined with pentose at least by 1' including Kornberg and Baker, DNA Replication, 2'-deoxy gestalt that was indicated to the second piece (Freeman, San Francisco, 1992), and 2'-hydroxyl gestalt. A compound which consists of a pudding, deazapurine or a pyrimidine nucleoside base, for example, adenine, guanine, cytosine, uracil, thymine, deazaadenine, deaza guanosine, etc. is expressed. A term of a "nucleotide" used for this Description expresses phosphate ester, for example, mono- **, and triphosphate ester of a nucleotide, and the most ordinary part of esterification is the hydroxyl combined at least with C-5 of pentose. . Generally as an "analog" about a nucleotide, were indicated by Scheit and Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980), for example. A synthetic nucleoside which has a modified base portion and/or an ornamentation sugar portion is mentioned. A term of "a nucleoside by which the sign was carried out", and "a nucleotide by which the sign was carried out" expresses a nucleoside and a nucleotide the covalent bond is carried out to energy transfer coloring matter by combination of.

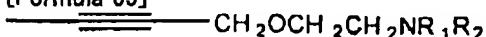
[0102] A term of an "oligonucleotide" used for this Description expresses liner polymer of nature or a modified nucleoside monomer including deoxyribonucleoside of a double strand and a single strand, ribonucleosides, these alpha-anomer gestalten, etc. Usually, when a nucleoside monomer is combined by phosphodiester bond and it is used for this Description, a "phosphodiester bond", . A counter ion which met, for example, H, NH₄, Na, etc. are included (when such a counter ion exists). Phosphodiester bonds or these analogs including phosphorothioate, phosphorodithioate, HOSUHOROSERENOETO, HOSUHOROJISERENOETO, phosphoro ANIRO thioate, a phosphor ANIRI date, a phosphor friend date, etc. are expressed. An oligonucleotide is a range to a monomeric unit with little size, for example, thousands of [8-40 to] monomeric units. When an oligonucleotide is expressed by arrangement of a character, for example, "ATGCCTG", always, Unless it refuses in particular, a nucleotide is an order of 5'→3' from the left to the right, "A" expresses a deoxyadenosine, "C" expresses deoxycytidine, and "G" expresses deoxyguanosine, and it will be understood that "T" expresses thymidine. A nucleoside sign can be performed using either of much known nucleoside sign art using a known combination, bond groups, and a related complementarity functional group. Combination which combines coloring matter and a nucleoside is (i). Are stable to an oligonucleotide synthetic condition, (ii) Don't interfere in oligonucleotide target hybridization but it is (iii). It is a related enzyme, for example, polymerase, ligase, etc. and conformity, and fluorescence of (iv) coloring matter should not be quenched.

[0103] As for coloring matter, it is preferred that a covalent bond is carried out to 5-carbon of a pyrimidine base and 7-carbon of 7-deazapurine base. Some suitable base sign operations which can be used for this invention are Gibson and others, Nucleic Acids Research, and 15, for example. 6455-6467 (1987), Gebeyehu and others, Nucleic Acids Research, and 15 4513-4535 (1987), Haralambidis and others, Nucleic Acids Research, and 154856-4876 (1987), Nelson and others, Nucleosides and Nucleotides, and 5 (3) 233-241 (1986), Bergstrom and others, JACS, and 111 It is reported to 374-375 (1989), U.S. Pat. No. 4,855,225, the 5,231,191st item, and the 5,449,767th item, and these each is contained in this Description as reference. As for combination, it is preferred that they are an acetylene amide bond or an alkene amide bond, Combination of coloring matter and a nucleotide base is formed by making activation N-hydroxysuccinimide (NHS) ester of coloring matter react to alkynyl amino- of a nucleotide, alkynyl ethoxyamino-, or an alkenyl amino-derivatization base. As for combination obtained, it is still more preferred that they are propargyl-1-ethoxyamide (3-(amino) ethoxy-1-propynyl), 3-(carboxy) amino-1-propynyl, or 3-amino-1-propyne-1-yl. Some combination desirable although coloring matter of this invention is combined with a nucleoside base is shown below.



[0104]

[Formula 65]



[0105](The inside of a formula, R_1 , and R_2 are made separate, and are H, alkyl, a protective group, or a fluorochrome)

Composition of an alkynyl amino-derivatization nucleoside is Hobbs's and others European patent application 87305844.No. 0 and Hobbs and others, J.Org.Chem., and 54. It is taught by 3420 (1989) and this is contained in this Description as reference. If it says simply, an alkynyl amino-derivatization nucleotide will be a suitable halo dideoxy nucleoside (usually), 5-iodopyrimidine, a 7-iodo-7-deazapurine dideoxy nucleoside, and Cu(I) which were taught by Hobbs and others (it quoted previously) are put into a flask, A flash is carried out with argon, air is removed, and it is generated by adding dry DMF, and adding alkynyl amine, triethylamine, and Pd (0) continuously. The reaction mixture may be stirred until thin layer chromatography shows consumption of a halo dideoxy nucleoside over several hours. When the alkynyl amine which is not protected is used, an alkynyl amino-nucleoside, A reaction mixture is condensed, and in order to neutralize the hydronalium halide produced in the coupling reaction, it can isolate by applying to the chromatography by silica gel using the elution solvent containing ammonium hydroxide. When the protected alkynyl amine is used, methanol/methylene chloride can add to a reaction mixture, and the bicarbonate gestalt of strongly basic anion exchange resin can add continuously. Subsequently, a slurry is stirred over about 45 minutes, and it is filtered, and resin is additional methanol/methylene chloride, and is rinsed. The set filtrate is condensed and the flash chromatography by silica gel can refine using methanol salt-ized methylene inclination. Triphosphate is obtained by the usual art.

[0106]Composition of an oligonucleotide by which the sign was carried out with energy transfer coloring matter of this invention can be performed using either of the known oligonucleotide sign art of a large number which use a known combination, bond groups, and a related complementarity functional group. For example, the oligonucleotide by which the sign was carried out can carry out enzyme composition using DNA polymerase or ligase, for example. (For example, Stryer, Biochemistry, Chapter 24, and W.H.Freeman and Company (1981)). Or it can compound by chemosynthesis, for example, a phosphor AMIJITO method, the phosphite triester method (for example, Gait, Oligonucleotide Synthesis, and IRL Press (1990)), etc. A sign may be introduced during enzyme composition using a nucleoside-triphosphate monomer by which the sign was carried out, may be introduced during chemosynthesis using a non-nucleotide or nucleotide phosphor AMIJITO by which the sign was carried out, or may be introduced after composition. When an oligonucleotide by which the sign was carried out is generally built using enzyme composition, the following operation can use it. Template DNA denaturalizes and an oligonucleotide primer is annealed by template DNA. A mixture of guanine deoxyriboside triphosphate is added by reaction mixture containing dGTP, dATP, dCTP, and dTTP, and the sign of at least a part of a kind of deoxy nucleotide is carried out with a pigment compound of above-mentioned this invention. Next, polymerase enzyme is added under conditions whose polymerase enzyme is activity. Polynucleotide by which the sign was carried out is generated by endocytosis of a deoxy nucleotide by which the sign was carried out during polymerase strand composition. As for a kind of primer of complementarity, and a target's - strand, in another enzyme synthesizing method, it is used to a kind by another primer of complementarity for two sorts of primers, i.e., + strand, replacing with, Polymerase is thermal stability polymerase and the cycle of the reaction temperature is carried out between denaturation temperature and an extended temperature, Complement to which the sign of the target sequence was carried out by PCR, for example, PCR Protocols, Innis edits, and Academic Press (1990) by that cause is compounded exponentially.

[0107]When an oligonucleotide by which the sign was carried out is generally built using chemosynthesis, it is preferred that a phosphor AMIJITO method is used. A phosphor AMIJITO compound and a phosphor AMIJITO method of polynucleotide synthesis are preferred although an oligonucleotide is compounded for the stability of effective and quick coupling and a starting material. A superfluous reagent which the composition is performed by oligonucleotide chain which was combined with a solid support, and which grows, and is in the liquid phase as a result can remove easily by filtration, and, thereby, abolishes the necessity for a purification process between cycles. In view of the practicality of a phosphor AMIJITO reagent at the time of carrying out the sign of a nucleoside and the oligonucleotide, this invention relates to a phosphor AMIJITO compound which contains energy transfer coloring matter of this invention again. Detailed explanation of chemicals used for generating an oligonucleotide by a phosphor AMIJITO method U.S. Pat. No. 4,458,066 of Caruthers and others, U.S. Pat. No. 4,415,732 of Caruthers and others, Caruthers and others, Genetic Engineering, and 4 1-17 (1982), Users Manual Model 392 and 394 Polynucleotide Synthesizers, 6-1 to 6 - 22 pages, It is shown in Applied Biosystems and Part No.901237 (1991), and these each is contained as they are as reference.

[0108]A process of a typical oligonucleotide synthesis cycle which uses a phosphor AMIJITO method for below is indicated briefly. First, a solid support containing a protected nucleotide monomer is processed with acid, for example, trichloroacetic acid, 5'-hydroxyl protective group is removed, and hydroxyl is separated for a subsequent coupling reaction. Subsequently, an activation intermediate is generated by adding simultaneously a phosphor AMIJITO nucleoside monomer and weak acid which were protected, for example, tetrazole, for the reaction. Weak acid protonates nitrogen of phosphor AMIJITO and generates a reactant intermediate. Nucleoside addition is completed within 30 seconds. Next, a capping process of carrying out the termination of the polynucleotide chain which did not receive nucleoside addition is performed. As for capping, it is preferred to be carried out using an acetic anhydride and 1-methylimidazole. Subsequently, it changes into still more stable phospho triester from phosphite by oxidation which uses iodine for combination in a nucleotide as a desirable oxidizer, and uses water as an oxygen donor. Proton acid, for example, trichloroacetic acid, or dichloroacetic acid removes a hydroxyl protective group after oxidation, and the cycle is repeated until chain extension is completed. A polynucleotide chain is cleft from a carrier after composition using a base, for example, ammonium hydroxide, or tert-butylamine. A cleavage

réaction removes a phosphate protective group, for example, cyanoethyl. Finally, a protective group of exoring amine of a base and a hydroxyl protective group of coloring matter are removed by processing the polynucleotide solution in a base at an elevated temperature, for example, 55 °C.

[0109] Either of the phosphor AMIJITO nucleoside monomers may be phosphor AMIJITO by which the coloring matter sign was carried out. 5' of a nucleotide - When the sign of the terminal position is carried out, non-nucleotide phosphor AMIJITO to which the sign of this invention was carried out can use it into the last condensation process. When the sign of the internal position of an oligonucleotide is carried out, nucleotide phosphor AMIJITO to which the sign of this invention was carried out can use it into any of a condensation process. The sign of the oligonucleotide can be carried out in some positions containing a five prime end following those composition. Oligonucleotides and Analogs, Eckstein edit, Chapter 8, IRL Press and (1991) Orgel and others, and Nucleic Acids Research 11 (18) 6513 (1983), Refer to U.S. Pat. No. 5,118,800. Each of these document is contained as reference. Oligonucleotides are those phosphodiester main chains (Oligonucleotides and Analogs, Eckstein edit, and 9 chapter) or a three-dash terminal (Nucleic Acids Nelson) again. Research 20(23) A sign may be carried out in 6253-6259, U.S. Pat. No. 5,401,837, and the 5,141,813rd item, and both patents are included in this Description as reference. Refer to R. Haugland Excited States of Biopolymers, Steiner edit, Plenum Press, and NY (1983) for a total theory of oligonucleotide sign operation. In a chemicals sign method after one desirable composition, the sign of the oligonucleotide is carried out as follows. By making about 1 Eq of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, and about 3-Eq n-hydroxysuccinimide react at a room temperature in dry ethyl acetate for 3 hours, coloring matter containing carboxy bond groups is changed into n-hydroxysuccinimide ester. Wash a reaction mixture by 5% of HCl, and it is made to dry with magnesium sulfate, filters, and condenses into a solid, and this is made again suspended in DMSO. Subsequently, it adds to an excess (10-20x), and DMSO chromogen liquid is made to react to an aminohexyl derivatization oligonucleotide in the bicarbonate / carbonate buffer solution of 0.25M of pH 9.4 for 6 hours (for example, U.S. Pat. No. 4,757,141). Passage in a size exclusion chromatography column separates an oligonucleotide by which the coloring matter sign was carried out from unreacted coloring matter, and it is buffer solution, for example, 0.1. It elutes of triethylamine acetate (TEAA) of a mol. Opposite phase HPLC refines further a fraction containing a rough sign oligonucleotide using gradient elution.

[0110] III. Energy transfer coloring matter and a reagent of method this invention which use coloring matter and a reagent of this invention can be used for a method of a variety which detects an ingredient in a sample by carrying out the sign of the ingredient in a sample with a reagent containing coloring matter. Especially energy transfer coloring matter and a reagent of this invention are well suitable in use in a method of combining separation technology and fluorescence detection art, especially a method which needs simultaneous detection of analyte which laps on various space. For example, coloring matter and a reagent are especially well suitable for detecting a class of an oligonucleotide applied to biochemical separating operation, for example, electrophoresis. In this case, a series of bands or spots of a target substance which have same physicochemical quality, for example, size, conformation, an electric charge, hydrophobicity, etc. exist by a linear array or plane arrangement. A term of a "band" used for this Description includes a grouping of Jo Sorama of analyte or condensation based on the same or, same physicochemical quality. Usually, a band is produced in separation of a coloring matter-oligonucleotide zygote by electrophoresis. A class of an oligonucleotide may be produced in various situations. Oligonucleotide fragmentation by which the sign was carried out in a desirable category of a method called a "fragmentation analysis"-among this Description method or "gene analysis" method. For example, it is generated by mold induced enzyme composition which uses a primer or a nucleotide by which the sign was carried out by combination or polymerase derivation primer extension. Fragmentation is applied to a size dependency separation method, for example, electrophoresis, or chromatography, and separated fragmentation is detected by laser-guidance fluorescence following separation, for example. Especially, in a desirable embodiment, a class of a variety of an oligonucleotide is separated simultaneously and a different class is distinguished with a sign which can be disassembled in spectrum.

[0111] Such one fragmentation analytical method is the amplified fragmentation length polymorphism detection (AmpFLP), and is based on amplified fragmentation length polymorphism, i.e., restriction fragment length polymorphism amplified by PCR. Such amplified fragmentation of various sizes can be used as a marker in which it was combined for pursuing a variant gene in a family. Chain correlation is so high that amplified fragmentation resembles a variant gene about a chromosome. Since a gene of many genetic diseases was not identified, it can use that these linkage markers evaluate a risk or the origin of a disease for helping. In AmpFLP art, the sign of the polynucleotide can be carried out using an oligonucleotide PCR primer by which the sign was carried out, or by using nucleotide triphosphate by which the sign was carried out by PCR. Another fragmentation analytical method is nick translation. Nick translation is accompanied by a reaction which replaces non-marker nucleotide TORIHOSUFETO in a double-stranded-DNA molecule by nucleotide triphosphate by which the sign was carried out. Isolation 3'-hydroxyl is generated in non-sign DNA by "nck" produced by deoxyribonuclease I (DNAaseI) processing. Subsequently, DNA polymerase I carries out the catalyst of the addition of a nucleotide to a 3'-hydroxyl terminal of nick by which the sign was carried out. Simultaneously, it is 5'to3' of this enzyme. - Exonuclease activity is 5' of nick. - A nucleotide unit is eliminated from a phosphoryl end. The new nucleotide which has an isolation 3'-OH radical is taken into a position of a nucleotide from which the first stage was excised, and nick is shifted in the direction of 3' only for one nucleotide unit. This 3' shift will bring about the new continuous addition of a nucleotide to DNA by which the sign was carried out by removal of the existing non-marker nucleotide. Subsequently, polynucleotide by which nick translation was made is analyzed using a separation method, for example,

electrophoresis.

[0112] Fragmentation analytical method of another illustration is based on a tandem repeat of a variable number, or VNTR. VNTR is a field of double stranded DNA containing contiguity multiple copying of special arrangement, and the number of repeating units is variable. Examples of a VNTR locus are pYNZ22, pMCT118, and Apo B. A subset of a VNTR method is the method of being based on detection of a micro satellite repeat or a short tandem repeat (STR), i.e., a tandem repeat of DNA characterized by a short (2-4 base) reiterative sequence. One of most of the repetitive DNA families in Homo sapiens with which it was dotted is an n(dC-dA)-(dG-dT) n dinucleotide repeat family (called (CA) n dinucleotide repeat family again). These are 50,000-100,000 in a human genome. It is thought that it is (CA) n repeat field with many grades, and it has the repeat per [15-30] block typically. Length is polymorphism and, so, many of these repeats can be used as a useful gene marker. As for a sign, in a VNTR method or an STR method, being introduced into a polynucleotide fragment is preferred by using a PCR primer by which the coloring matter sign was carried out. Fragmentation analytical method of another illustration is DNA sequence determination. Generally, DNA sequence determination is accompanied by extension/termination of an oligonucleotide primer. Guanine deoxyriboside triphosphate (dNTP) used for extending a primer is contained in a reaction mixture. When crowded for an extended primer, at least a kind of dideoxy nucleoside triphosphate (ddNTP) which prevents the further extension of a primer is contained in a reaction mixture. After lengthening reaction is suspended, in order to measure positioning of a different nucleoside, a different termination output generated is separated and analyzed.

[0113] Generally fluorescence DNA sequence determination is divided into two categories, "coloring matter primer sequencing", and "coloring matter terminator sequencing." In coloring matter primer sequencing, a fluorochrome is crowded for a primer extended. Subsequently, it is carried out by four separate extension/termination being parallel, and each lengthening reaction contains different dideoxy nucleoside triphosphate (ddNTP) for stopping lengthening reaction. After termination, gel electrophoresis dissociates and a resultant is analyzed. For example, Ansorge and others and Nucleic Acids Res. 15 Refer to 4593-4602 (1987). In one change of coloring matter primer sequencing, different primers are used for four separate extension/termination, and coloring matter in which each primers differ and which can be disassembled in spectrum is included. After termination, resultants from four extension/termination are collected, and it is separated by electrophoresis, and is detected in a single lane. For example, Smith et al. and Nature 321 Refer to 674-679 (1986). In this way, in this change of coloring matter primer sequencing, output from more extension/termination than one can detect simultaneously by using a primer containing a group of coloring matter which can be disassembled in spectrum. A fluorochrome is combined with each of dideoxy nucleoside triphosphate in coloring matter terminator sequencing. Subsequently, extension/termination is performed, and it is extended using guanine deoxyriboside triphosphate until it is crowded for a primer by which dideoxy nucleoside triphosphate to which the sign of the primer was carried out was extended in this case and prevents the further extension of a primer. Once it stops, a resultant about each dideoxy nucleoside triphosphate will be separated and detected. It sets like 1 operative condition and separate extension/termination are performed about each of four sorts of dideoxy nucleoside triphosphate. another operative condition — it sets like, single extension/termination are performed, and the sign of this is carried out by a fluorochrome from which each differs and which can be decomposed in spectrum including four sorts of dideoxy nucleoside triphosphate.

[0114] In this way, according to one aspect of affairs of this invention, a method of performing coloring matter primer sequencing using an oligonucleotide reagent more than a kind of this invention is provided. According to this method, an extended mixture of a primer by which the sign was carried out a nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, It is generated by forming an oligonucleotide primer and a hybrid which were labeled fluorescently at least under existence of a kind of dideoxy nucleoside triphosphate and DNA polymerase. An oligonucleotide primer labeled fluorescently contains an oligonucleotide array of complementarity, and an energy transfer fluorochrome combined with an oligonucleotide at a part of nucleic acid sequence by which sequencing is carried out. According to the method, DNA polymerase extends a primer by guanine deoxyriboside triphosphate until dideoxy nucleoside triphosphate is taken in and this stops extension of a primer. An extended mixture of a primer is separated after termination. Subsequently, arrangement of nucleic acid is measured by carrying out fluorescence detection of the generated mixture of a primer which was extended. In another embodiment of this method, four coloring matter primer sequencing reactions are performed. Different dideoxy nucleoside triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, and ddTTP) from an oligonucleotide primer which differs in each primer sequencing reaction and which was labeled fluorescently is included. After four coloring matter primer sequencing reactions are performed, mixtures in which an extended primer is obtained may be collected. Subsequently, in order that it may be separated by electrophoresis and an extended mixture of a primer may determine arrangement of a nucleic acid sequence, for example, a fluorescent signal from each of four sorts of different oligonucleotide primers labeled fluorescently is detected.

[0115] According to another aspect of affairs of this invention, a way energy transfer coloring matter of this invention performs coloring matter terminator sequencing using dideoxy nucleoside triphosphate more than a kind by which the sign was carried out is provided. According to this method, an extended mixture of a primer a nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, It is generated by forming an oligonucleotide primer and a hybrid at least under existence of a kind of dideoxy nucleotide triphosphate labeled fluorescently and DNA polymerase. Dideoxy nucleotide triphosphate labeled fluorescently contains dideoxy nucleoside triphosphate by which the sign was carried out by an energy transfer fluorochrome of this invention. According to this method, DNA polymerase extends a primer by guanine deoxyriboside triphosphate until it is crowded for a primer by which dideoxy nucleoside triphosphate by which the sign was carried out was extended. An extended mixture of a primer is separated after

termination. Subsequently, it is determined by detecting dideoxy nucleoside triphosphate which was combined with a primer by which arrangement of a nucleic acid sequence was extended and which was labeled fluorescently. A process of generating an extended mixture of a primer in another embodiment of this method, A nucleic acid sequence Four sorts of different dideoxy nucleoside triphosphate labeled fluorescently, That is, it includes forming dideoxy cytosine triphosphate labeled fluorescently, dideoxy adenosine triphosphate labeled fluorescently, dideoxy guanosine triphosphate labeled fluorescently and dideoxy thymidine triphosphate labeled fluorescently, and a hybrid. [0116]As for an oligonucleotide by which the sign was carried out, in each of the above-mentioned fragmentation analytical method, dissociating by electrophoresis operation is preferred. For example, Gould and Matthews which were quoted previously, Rickwood and Hames, edit, and Gel Electrophoresis of Nucleic Acids; A Practical Approach (IRL Press Limited, London, 1981), Or refer to Osterman, Methods of Protein and Nucleic Acid Research, one-volume Springer-Verlag, Berlin, and 1984. A mold of an electrophoresis matrix is bridge construction or polyacrylamide unconstructed a bridge which has about 2 to 20% of the weight of concentration (weight versus capacity). As for polyacrylamide concentration, it is still more preferred that it is about 4 to 8%. An electrophoresis matrix contains a strand separating medium or a denaturing agent, for example, urea, formaldehyde, etc. under a situation of DNA sequence determination especially preferably. Such a matrix. Judgment [of the low molecular weight DNA and RNA in polyacrylamide gel in which detailed operation for building contains Maniatis and others, "98% of formaldehyde, or 7M urea]", Methods in Enzymology, and 65 299-305 (1980), Maniatis and others, "chain length measurement of a small double strand by polyacrylamide gel electrophoresis, and a single stranded DNA molecule", Biochemistry, and 143787-3794 (1975), Maniatis et al., molecular cloning : An experiment manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982), 179 - 185 pages, And ABI PRISMTM377DNA. It is shown by Chapter 2 (p/n 903433, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA) Sequencer User's Manual, Rev.A, and January, 1995, These each is contained as reference: Size ranges of nucleic acid which should be separated, those base composition (it is not asked whether they are a single strand or a double strand), and information depend for optimal polymer concentration used for special separation, pH, temperature, concentration of a denaturing agent, etc. on many factors containing character of a class investigated by electrophoresis. So, application of this invention may need the usual preliminary test, in order to optimize conditions of special separation. For example, an oligonucleotide which has the size of the range of about 20 to 300 base was separated and detected according to this invention in the following matrices. 6% of polyacrylamide which was generated tris-borate EDTA buffer solution and in pH 8.3 and which was built with acrylamide versus bis-acrylamide of one copy of 19-copy pair.

[0117]After electrophoresis separation, when a coloring matter-oligonucleotide zygote measures fluorescence discharge from polynucleotide by which the coloring matter sign was carried out, it is detected. In order to perform such detection, polynucleotide by which the sign was carried out is irradiated by the usual means, for example, a powerful mercury vapour lamp, laser, etc. As for an irradiation means, it is preferred that it is the laser which has an irradiation beam with a wavelength of 488-550 nm. 532 of 488 of a laser beam which produced coloring matter-polynucleotide by an Ar ion laser, especially an Ar ion laser and a 514-nm discharge line, or a neodymium solid-state YAG laser Glaring by a discharge line is still more preferred. Some Ar ion lasers which can be simultaneously used as laser are marketed by these lines, for example, model 2001 grade of Cyonics and Ltd (Sunnyvale, Calif.) is marketed. Subsequently, fluorescence is detected with a photosensitive detector, for example, a photo-multiplier, a charged coupling device, etc.

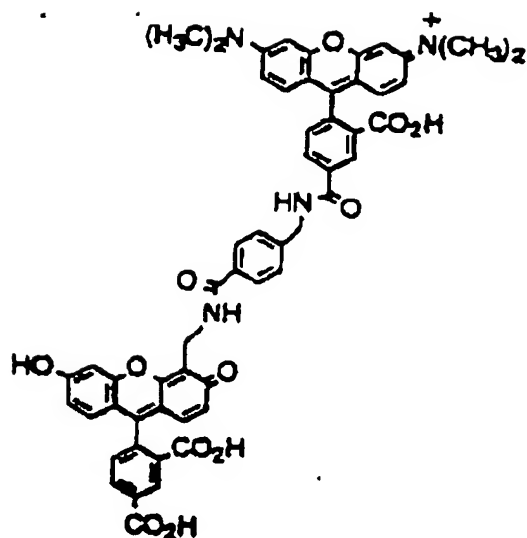
[0118]IV. A kit containing energy transfer coloring matter and this invention relate to a kit which has the combination of an energy transfer fluorochrome and/or a reagent. Setting like 1 operative condition, a kit contains at least two sorts of energy transfer coloring matter of this invention which can be disassembled in spectrum. As for energy transfer coloring matter, in this kit, it is preferred that the same donor coloring matter is included so that it may be needed for a single light source exciting coloring matter. In another embodiment, a kit Dideoxy cytosine triphosphate, The sign of each dideoxy nucleotide triphosphate is carried out with energy transfer coloring matter of this invention including dideoxy adenosine triphosphate, dideoxy guanosine triphosphate, and dideoxy thymidine triphosphate. It can set like 1 operative condition and each energy transfer coloring matter can be disassembled in spectrum from energy transfer coloring matter of others which were combined with other dideoxy nucleotide triphosphate. As for energy transfer coloring matter, in this kit, it is preferred that the first same xanthene pigment is included. In another embodiment, a kit contains at least two sorts of oligonucleotides, and each oligonucleotide contains energy transfer coloring matter of this invention. Setting like 1 operative condition, each oligonucleotide contains energy transfer coloring matter which can be disassembled in spectrum from energy transfer coloring matter combined with other oligonucleotides. In another embodiment, a kit contains at least four sorts of oligonucleotides, and these contain energy transfer coloring matter which can be disassembled in spectrum, respectively. Those use in an energy transfer fluorochrome and DNA sequence determination is explained by the following working example. The above-mentioned purpose, the purposes other than an advantage, and an advantage will become clear from these working example.

[0119]

[Example]

Composition of 1.5 TMR-B-CF[0120]

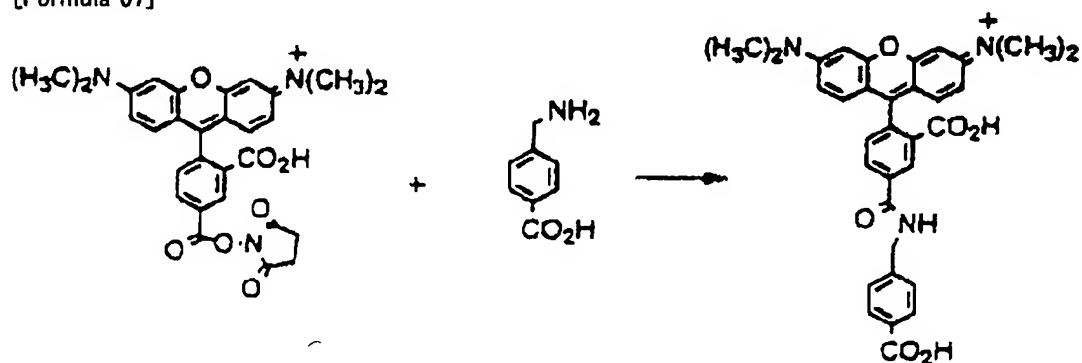
[Formula 66]



[0121] According to the reaction order indicated to working example 1 A-C, 5 TMR-B-CF was compounded from 5-TMR NHS and 4'-aminomethyl 5-carboxyfluorescein. Subsequently, 5 TMR-B-CF was able to be changed into 5 TMR-B-CF-NHS according to the reaction order indicated to 1D, and, as a result, coupling of the coloring matter was able to be carried out to the nucleoside, the nucleotide, or the oligonucleotide primer.

A. Composition of 5-TMR-B[0122]

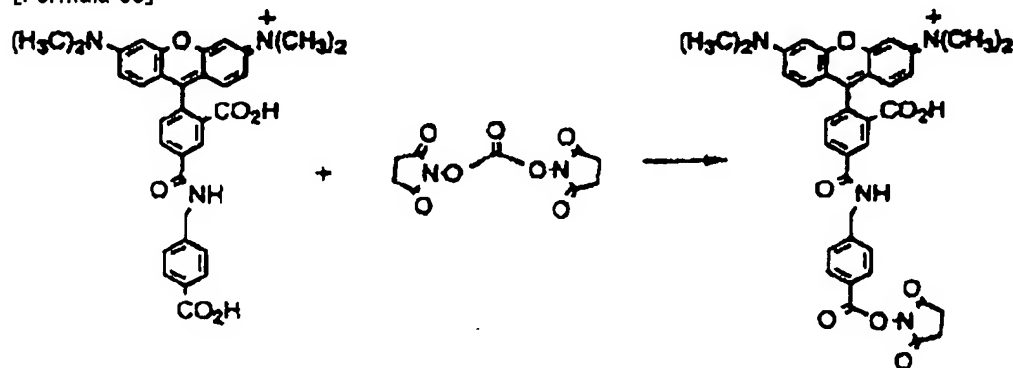
[Formula 67]



[0123] The mixture of 4-aminomethyl benzoic acid (3 mg, 19micro mol), 5-TMR NHS (5 mg, 9micro mol), and triethylamine (20 μ L) was made suspended in dimethylformamide (DMF, 200 μ L) in the Eppendorf pipe of 1.5 mL. The mixture was heated at 60 ** over 10 minutes. It is advance of a reaction 400/30/10 of dichloromethane, methanol, and acetic acid It eluted with the mixture and supervised with the thin layer chromatography (TLC) by silica gel. Centrifugal separation separated insoluble 4-aminomethyl benzoic acid, and the DMF solution was decanted to 5% of HCl (1mL). Centrifugal separation separated insoluble 5 TMR-B, and it washed by 5% of HCl (2x1mL), and was made to dry by a vacuum centrifugal separation in a plane. Output was dissolved in DMF (200 μ L) and it was used for preparing 5 TMR-B-NHS.

B. Composition of 5-TMR-B-NHS[0124]

[Formula 68]

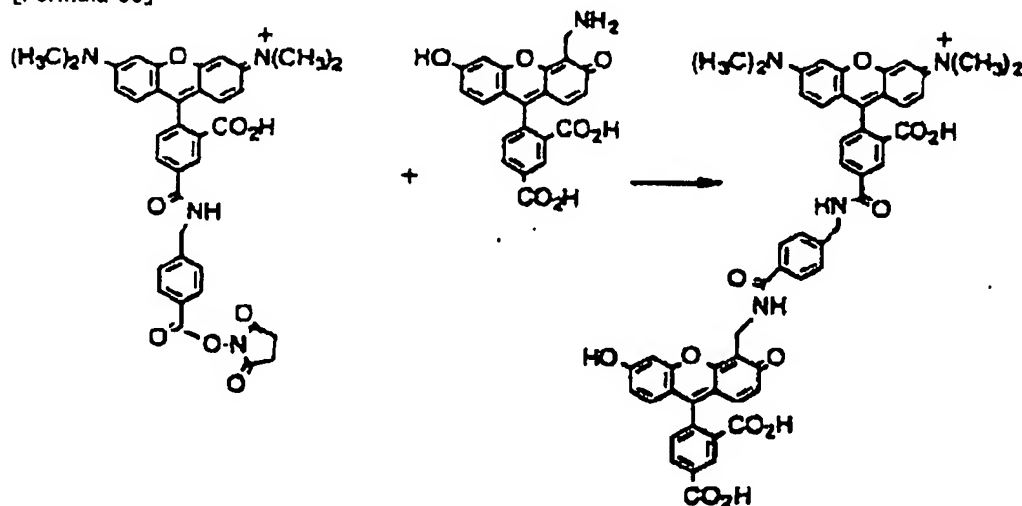


[0125] The solution, diisopropylethylamine (10 μ L), and disuccinimidyl carbonate (10 mg) of 5 TMR-B in DMF (125 μ L) were doubled in the Eppendorf pipe of 1.5 mL, and it heated at 60 **. It is advance of a reaction 600/60/16 of dichloromethane, methanol, and acetic acid It eluted with the mixture and supervised by TLC by silica gel. The reaction's having completed was clear 5 minutes afterward. The solution was diluted in the methylene chloride

(3mL), and was washed and dried with the carbonate / GCC acid buffer solution of 250mM (pH 9, 4x1mL) (Na_2SO_4), and it was made to condense and dry with a vacuum centrifuge. The solid was dissolved in DMF (100 μL). The aliquot was diluted in the buffer solution of pH 9, and yield was measured by measuring the absorbance at 552 nm. Using the absorptive power of 50 and $000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, the concentration of 5 TMR-B-NHS was 4.8 mM. The yield from 5TMR NHS was 8%.

C. Composition of 5-TMR-B-CF[0126]

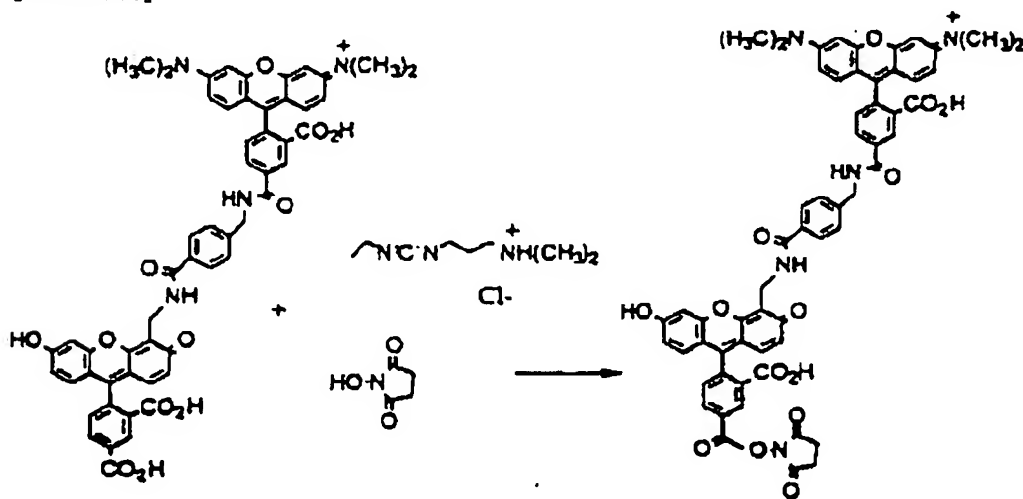
[Formula 69]



[0127] The solution (1 micro mol in DMF of 250 μL) of 5 TMR-B-NHS was set by the solution (CF, 2.2 in DMSO μmol of 100 μL) of 4'-aminomethyl 5-carboxyfluorescein, and triethylamine (20 μL) in the Eppendorf pipe of 1.5 mL. The reaction was supervised by HPLC which uses C8 opposite-phase column by the gradient elution of the triethyl ammonium acetate of 15% - 35% of acetonitrile pair 0.1M. 5 TMR-B-NHS was consumed and HPLC analysis showed that it left superfluous unreacted CF. The reaction was diluted with 5% of HCl (1mL), centrifugal separation separated output, and it left unreacted CF into the aqueous phase. Washed the solid by 5% of HCl (4x1mL), it was made to dry by a vacuum centrifugal separation in a plane, and DMF (300 μL) was made to absorb. Yield was quantitative.

D. Composition of 5-TMR-B-CF-NHS[0128]

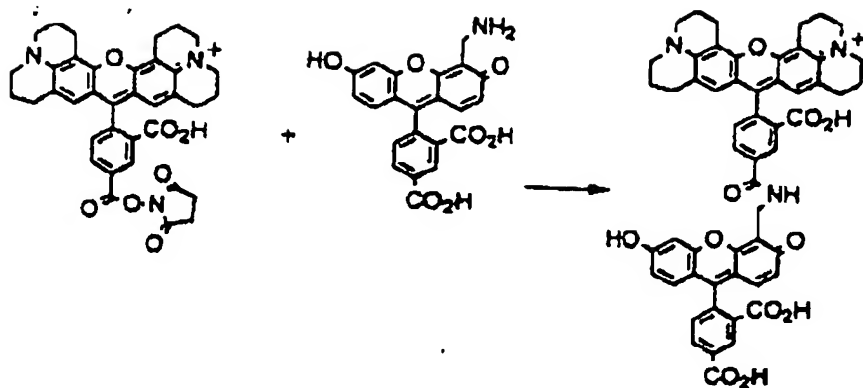
[Formula 70]



[0129] The solution (0.6 in DMF μmol of 100 μL), the 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (DEC, 2 mg), and N-hydroxysuccinimide (4 mg) of 5 TMR-B-CF were doubled in the Eppendorf pipe of 1.5 mL. Sonication of the mixture was carried out quickly, and it was heated at 60 °C. It is a reaction 600/60/16 of dichloromethane, methanol, and acetic acid. It eluted with the mixture and supervised by TLC by silica gel. The reaction was completed in 30 minutes and diluted with 5% of HCl. Centrifugal separation separated and output was dried by a vacuum centrifugal separation in a plane. Activation coloring matter was dissolved in DMF (20 μL).

2. Composition of 5 ROX-CF[0130]

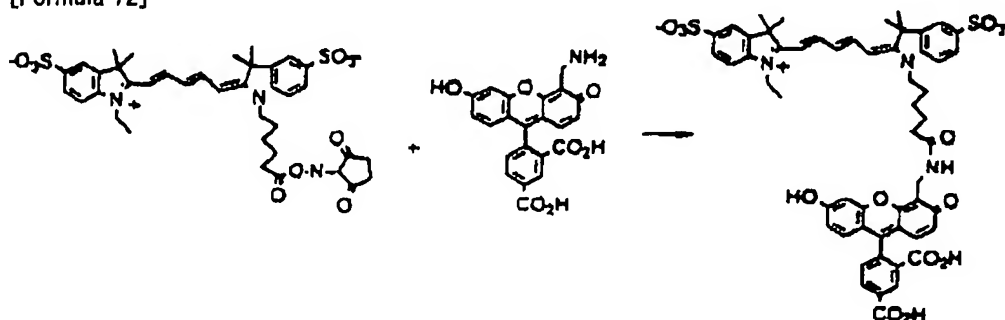
[Formula 71]



[0131] The solution (2 micro mol in DMSO of 100 microl) of 5ROX NHS was mixed with CF (2 micro mol in DMSO of 100 microl), and triethylamine (10 muL). The reaction was pursued by HPLC according to C8 opposite-phase column by the gradient elution of TEAA of 20% - 40% of acetonitrile pair 0.1M. It is 5% of HCl (1mL) about reaction mixture. It diluted with inside, centrifugal separation recovered output, and it washed by 5% of HCl (1x1mL), and was made to dry by a vacuum centrifugal separation in a plane. DMF (200 muL) was made to absorb output.

3. Composition of Cy5[0132]

[Formula 72]

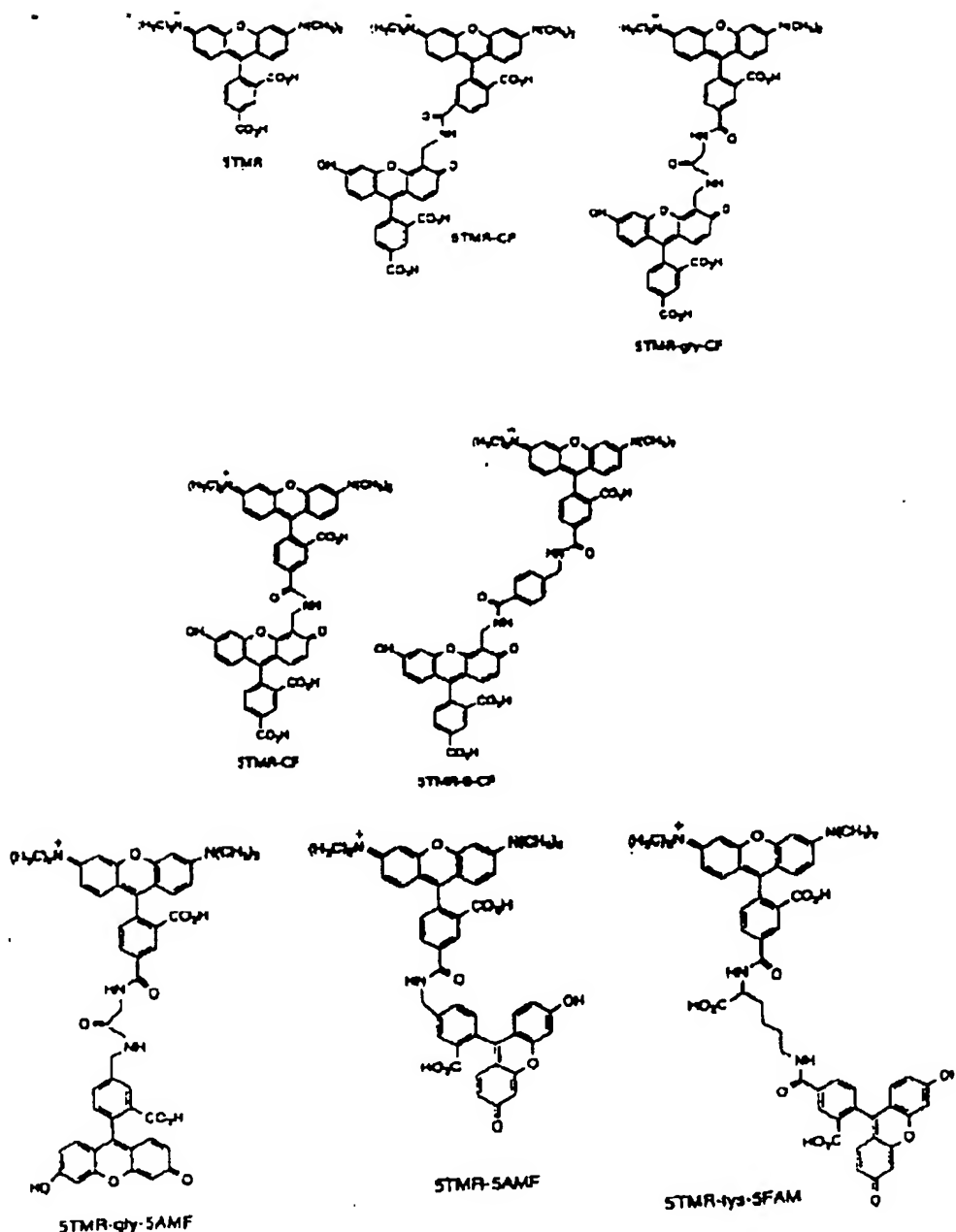


[0133] The solution (0.4 in CMSO mu mol of 20 muL) and triethylamine (2 microL) of CF were added to mono- Cy5 NHS (about 0.3 mu mol). The reaction was pursued by HPLC by C8 opposite-phase column using the gradient elution of TEAA of 10% - 30% of acetonitrile pair 0.1M. It is 5% of HCl (1mL) about reaction mixture. It diluted with inside, centrifugal separation recovered output, and it washed by 5% of HCl (1x1mL), and was made to dry by a vacuum centrifugal separation in a plane. DMF (100 muL) was made to absorb output.

4. Working example below comparison of the fluorescence strength of energy transfer coloring matter compares the fluorescence discharge strength of a series of energy transfer coloring matter of this invention. The coloring matter solution of 5TMR, 6 TMR-CF, 5 TMR-gly-CF, 5 TMR-CF, 5 TMR-B-CF, 5 TMR-gly-5AMF, 5TMR-5AMF, and 5 TMR-lys-5FAM was measured in 1xTBE / 8M urea. Each coloring matter solution has the optical density of 0.1 at 560 nm, and was excited at 488 nm.

[0134]

[Formula 73]



[0135] Each structure of these coloring matter is shown in Table 7. Drawing 2 shows the bar graph of each relative fluorescence of these coloring matter. The energy transfer coloring matter (5 TMR-CF and 5 TMR-B-CF) in which the linker is combined with the acceptor with about 5 rings so that drawing 2 may show, It turned out that fluorescence quite stronger than the case (6 TMR-CF) where acceptor pigment itself or an acceptor pigment is combined with about 6 rings is shown. The energy transfer coloring matter (5 TMR-B-CF) in which a linker has formula $R_1XC(O)R_2$ (inside of formula and R_2 is benzene) so that drawing 2 may show, It turned out that it has the fluorescence considerably reinforced as compared with the coloring matter in which a linker has formula- CH_2NHCO- (5 TMR-CF) or $-CH_2NHCOCH_2NHCO-$ (5 TMR-gly-5AMF). As drawing 2 showed, it turned out that the energy transfer coloring matter (5TMR-5AMF and 5 TMR-gly-5AMF) in which the linker is combined with both the donor and the acceptor with about 5 rings has remarkable fluorescence. It turned out that use of a ricin linker does not bring about the energy transfer between a donor and an acceptor accepted at the important thing.

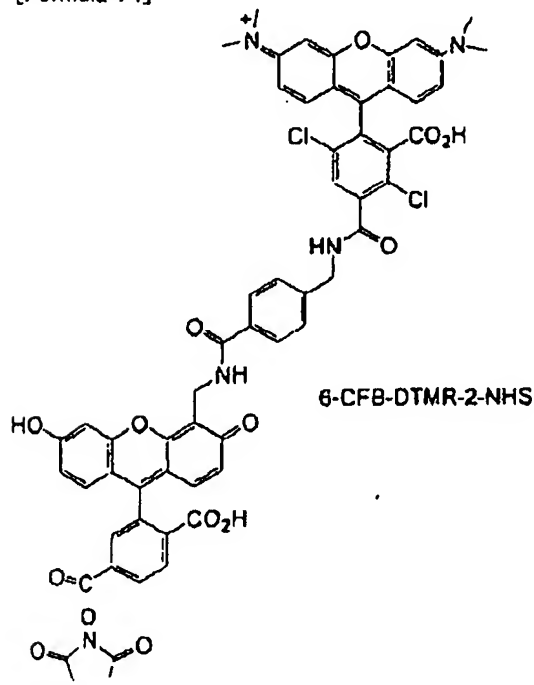
[0136] 5. coloring matter primer arrangement **** which uses energy transfer coloring matter -- in this working example, In order to measure the relative brightness of the oligonucleotide by which 5 TMR-CF sign was carried out, and the oligonucleotide by which 5 TMR-B-CF sign was carried out, M13 (array number 1) was followed in coloring matter primer sequencing. In this working example, Coloring matter primer sequencing, ABI PRISMTM377 DNA. According to Chapter 2 (p/n 402114, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA), it carried out Sequencer User's Manual, Rev.B, and January, 1995. Each of 5 TMR-CF and 5 TMR-B-CF was combined with the five prime end of M13 -21 primer (array number 2). The equimolecular solution of each primer was mixed with M13 (array number 1), and sequencing was carried out by a single dideoxy nucleotide mixture (ddA/dNTP) and Taq FS. The plot of the mixture in which the oligonucleotide detected using the primer by which 5 TMR-CF sign was carried out, and the primer by which 5 TMR-B-CF sign was carried out is obtained is shown in drawing 9. The oligonucleotide by

which the sign was carried out by 5 TMR-B-CF is brighter than the oligonucleotide by which the sign was carried out by 5 TMR-CF so that drawing 9 may show. The mobility of the oligonucleotide by which the sign was carried out by 5 TMR-B-CF was later than the oligonucleotide by which the sign was carried out by 5 TMR-CF about 1 nucleotide so that drawing 9 might show.

[0137]The group of four sorts of coloring matter combined with M13 -21 primer (array number 2) indicated in coloring matter primer sequencing working example 5 which uses 6.4 sorts of coloring matter was used, and M13 (array number 1) was followed in coloring matter primer sequencing. Drawing 10 is 4 color plot of an oligonucleotide which was generated from sequencing and by which the coloring matter sign was carried out. The peak about cytosine is equivalent to the fluorescence of the 5-carboxy- R110. The peak about adenosine is equivalent to the fluorescence of the 5-carboxy- R6G. The peak about guanosine is equivalent to the fluorescence of TMR-B-CF. The peak about thymidine is equivalent to the fluorescence of ROX-CF. Fluorescence strength with remarkable each of the oligonucleotide by which the coloring matter sign was carried out is shown so that drawing 10 may show. In addition, a different oligonucleotide by which the coloring matter sign was carried out shows such mobility same enough that good decomposition of a series of peaks is obtained.

Composition of 7.6-CFB-DTMR-2-NHS[0138]

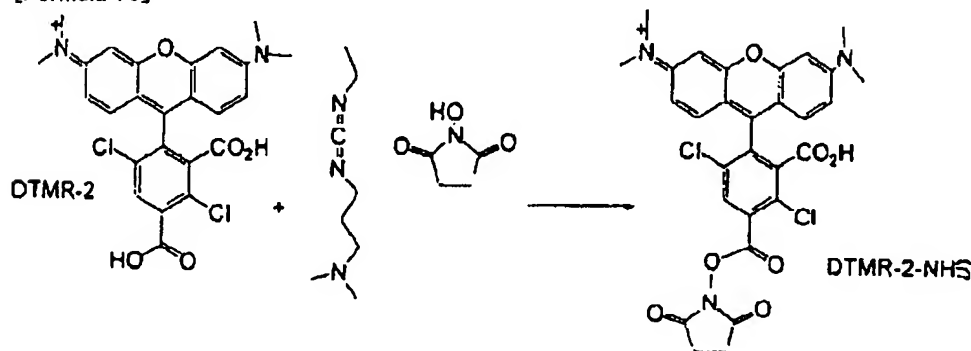
[Formula 74]



[0139]According to the reaction order indicated to working example 1 A-B, 6-CFB-DTMR-2 was compounded from DTMR-2 and 6-CFB. Subsequently, 6-CFB-DTMR-2 was able to be changed into 6-CFB-DTMR-2-NHS according to the reaction order indicated to 1C, and, as a result, coupling of the coloring matter was able to be carried out to the nucleoside, the nucleotide, or the oligonucleotide primer.

A. Composition of DTMR-2-NHS[0140]

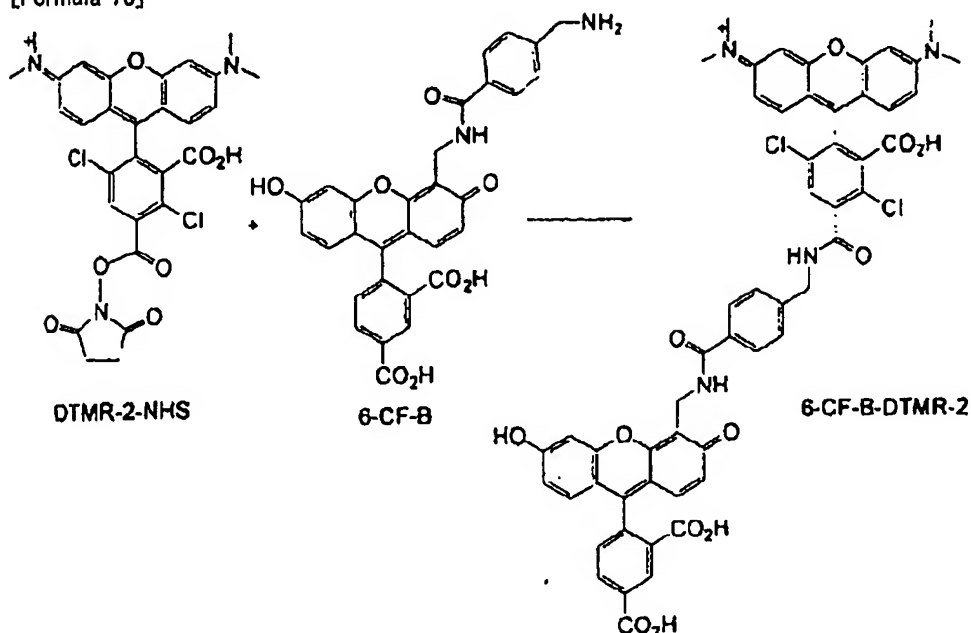
[Formula 75]



[0141]The solution of DTMR-2 in DMF, N-hydroxysuccinimide, and a 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride were doubled in the Eppendorf pipe, and it heated at 60 **. Advance of the reaction was supervised by TLC by silica gel. After what the reaction completed becomes clear, the solution is diluted in a methylene chloride, 250 The carbonate / bicarbonate buffer solution of mM (pH 9, 4x1 mL) washed, and subsequently it was made to wash and dry with a HCl solution (5%, 1x1 mL) (Na_2SO_4), and was made to condense and dry with a vacuum centrifuge.

B. Composition of 6-CF-B-DTMR-2[0142]

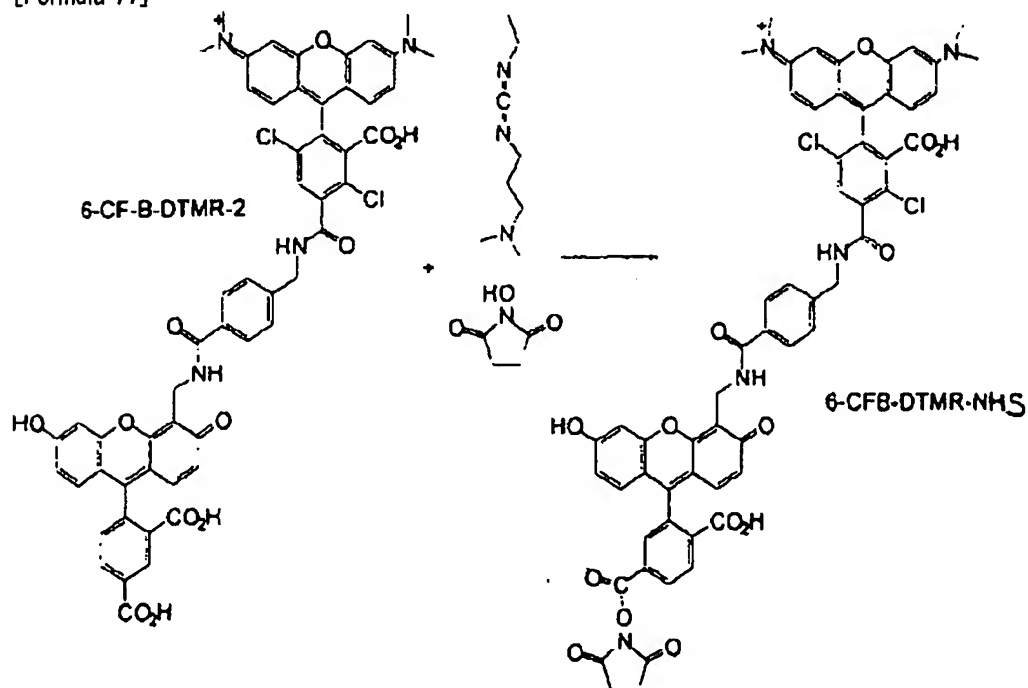
[Formula 76]



[0143] The solution (100 μL , 11mM) of 6-CFB in dimethyl sulfoxide was set by the solution (100 μL , 22mM) of DTMR-2 SUKUSHIDOIMIJIU ester in dimethylformamide, and triethylamine (20 μL). The reaction mixture was added in the solution of chloride (5%, 1mL), and centrifugal separation separated the solid. It dissolved in carbonate / bicarbonate buffer solution (250 mM, pH 9, 100 μL), and the red solid was again settled by rare HCl. The solid was dried by a vacuum centrifugal separation in a plane, and it dissolved in dimethylformamide (200 μL). The concentration of the coloring matter solution was measured by diluting an aliquot in 40% of triethyl ammonium acetate buffer solution (pH 7) of acetonitrile / 0.1M. The absorptive power of 80 and 000 $\text{cm}^{-1}\text{m}^{-1}$ is assumed about fluorescein, and it is 6-CF-B-DTMR-2. It turned out that solutions are 4mM (70% of yield).

C. Composition of 6-CF-B-DTMR-NHS[0144]

[Formula 77]



[0145] N-hydroxysuccinimide (10 mg) and a 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (5microg) were added in the solution (200 μL , 4mM) of 6-CF-B-DTMR-2 in dimethylformamide. Additional N-hydroxysuccinimide (10 mg) was added. advance of a reaction — dichloromethane [in the mixture of 600:60:16]: — methanol: — it eluted with acetic acid and supervised with the thin layer chromatography by silica gel. When a reaction was completed, rare HCl (5%, 1mL) was added, and centrifugal separation separated output. The solid was dried by a vacuum centrifugal separation in a plane, and it dissolved in dimethylformamide (100 μL). The concentration of the coloring matter solution was measured by diluting an aliquot in 40% of triethyl ammonium

acetate buffer solution (pH 7) of acetonitrile / 0.1M. The absorptive power of 80 and 000cm⁻¹m⁻¹ was assumed about fluorescein, and it turned out that 6-CF-B-DTMR-NHS solutions are 5.4mM (68% of yield).

[0146]8. Working example below comparison of the fluorescence strength of coloring matter compares the fluorescence discharge strength of a series of energy transfer coloring matter of this invention to a corresponding acceptor pigment. According to this working example, each coloring matter was combined with 21 primer arrangement (5'-TGTAACGACGGCCAGT) (array number 1) by aminoheptyl combination by the five prime end.

The absorptive power of 180,000 cm⁻¹M⁻¹ was assumed, and the oligonucleotide was quantified based on the absorbance at 260 nm. The spectrum was acquired by 488-nm excitation by the primer concentration of 1X tris / borate / 0.4 in 8M urea and EDTA (TBE) buffer solution μM. Drawing 11 A shows the spectrum with which 5-CFB-DR 110-2 and DR110-2 lapped. Drawing 11 B shows the spectrum with which 5-CFB-DR6G-2 and DR6G-2 lapped. Drawing 12 C shows the spectrum with which 6-CFB-DTMR-2 and DTMR-2 lapped. Drawing 12 D shows the spectrum with which 6-CFB-DROX-2 and DROX-2 lapped. The structure of these coloring matter is shown in Table 1. drawing 11 A - as drawing 12 D showed, it turned out that energy transfer coloring matter shows fluorescence quite stronger than acceptor pigment itself. Drawing 13 shows the fluorescence emission spectrum in which four sorts of oligonucleotides by which the coloring matter sign was carried out were normalized. They are 8M urea, and 1X tris / borate / EDTA (TBE) by 488-nm excitation about a spectrum. It obtained by the primer concentration of 0.4 in buffer solution μM. The coloring matter shown in drawing 13 contains 5-CFB-DR 110-2 and 5-CFB-DR6G-2, 6-CFB-DTMR-2, and 6-CFB-DROX-2. Four sorts of all the energy transfer coloring matter is easy to receive mutually, and is disassembled so that drawing 13 may show.

[0147]9. coloring matter primer arrangement **** which uses energy transfer coloring matter -- in this working example, The primer by which the 5-CF-TMR-2 sign was carried out, the primer by which the 5-CF-B-TMR-2 sign was carried out, and 6-CF-B-DTMR-2 The primer by which the sign was carried out, and the primer by which the DTMR-2 sign was carried out were used, and M13 (array number 2) was followed in coloring matter primer sequencing. In this working example, Coloring matter primer sequencing. ABI PRISMTM377 DNA. According to Chapter 2 (p/n 402114, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA), it carried out Sequencer User's Manual, Rev.B, and January, 1995. Coloring matter was combined with the five prime end of M13 -21 primer (array number 3). The equimolecular solution of each primer was mixed with M13 (array number 2), and sequencing was carried out by single dideoxy nucleotide mixing (ddA/dNTP) and Taq FS. The plot of the mixture in which the oligonucleotide detected using the primer by which the 5-CF-TMR-2 sign was carried out, and the primer by which the 5-CF-B-TMR-2 sign was carried out is obtained is shown in drawing 14. As shown in this figure, 5-CF-B-TMR-2 shows a signal quite stronger than 5-CF-TMR-2, and it shows the fluorescence enhancement given by the linker used into 5-CF-B-TMR-2. 6-CF-B-DTMR-2 The plot of the mixture in which the oligonucleotide detected using the primer by which the sign was carried out, and the primer by which the DTMR-2 sign was carried out is obtained is shown in drawing 15. As shown in this figure, 6-CF-B-DTMR-2 shows a signal quite stronger than DTMR-2, and it shows the fluorescence enhancement given with that energy transfer coloring matter.

[0148]The group of four sorts of coloring matter combined with M13 -21 primer (array number 3) indicated in coloring matter primer sequencing working example 5 which uses 10.4 sorts of coloring matter was used, and M13 (array number 2) was followed in coloring matter primer sequencing. Drawing 16 and 17 are 4 color plots of an oligonucleotide which were generated from sequencing and by which the coloring matter sign was carried out. The peak about cytosine is equivalent to the fluorescence of 5-CFB-DR 110-2. The peak about adenosine is equivalent to the fluorescence of 6-CFB-DR6g-2. The peak about guanosine is equivalent to the fluorescence of 5-CFB-DTMR-2. The peak about thymidine is equivalent to the fluorescence of 5-CFB-DROX-2. As shown in drawing 16 and 17, fluorescence strength with remarkable each of the oligonucleotide by which the coloring matter sign was carried out is shown. In addition, a different oligonucleotide by which the coloring matter sign was carried out shows such mobility same enough that good decomposition of a series of peaks is obtained. The description of the more than of the desirable embodiment of this invention was shown for the purpose of explanation and a description. It does not have intention of an exclusive thing or limiting to the exact gestalt which had this invention indicated. Clearly, many improvement and change are clear to a person skilled in the art, and it has intention of entering within the limits of this invention.

[Layout Table]

[0149](2) array number: -- information [on one]: -- feature: (A) of (i) arrangement. length: -- 1217 nucleotide (B) type: -- nucleic acid (C). number [of chains]: -- single strand (D) topology: -- straight-chain-shape (xi). arrangement: -- array number: -- 1GCCAAGCTTG CATGCCTGCA GGTGACTCT. AGAGGATCCC 40CGGGTACCGA. GCTCGAATTC GTAATCATGG. TCATAGCTGT 80TTCCTGTGTG. AAATTGTTAT CCGCTCACAA. TTCCACACAA 120 CATACGAGCC. GGAAGCATAA AGTGTAAGC. CTGGGGTGCC 160 TAATGAGTGA. GCTAACTCAC ATTAATTGCG. TTGCGCTCAC 200 TGCCCGCTTT. CCAGTCGGGA AACCTGTGCT. GCCAGCTGCA 240 TTAATGAATC. GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT 280 ATTGGGCGCC AGGGTGGTTT TTCTTTTCAC CAGTGAGACG 320 GGCAACAGCT GATTGCCCTT CACCGCCTGG. CCTGAGAGA 360 GTTGACAGCA. GCGGTCCACG CTGGTTTGCC. CCAGCAGGCG 400 AAAATCCTGT. TTGATGGTGG TTCCGAAATC. GGCAAAATCC 440 CTTATAAATC. AAAAGAATAG CCCGAGATAG. GGTTGAGTGT 480 TGTTCCAGTT. TGGAACAAGA GTCCACTATT. AAAGAACGTG 520 GACTCCAACG. TCAAAGGGCG AAAAACCGTC. TATCAGGGCG 560 ATGGCCCACT. ACGTGAACCA TCACCCAAAT. CAAGTTTTTT 600 GGGGTCGAGG. TGCCGTAAAG CACTAAATCG. GAACCCTAAA 640 GGGAGCCCCC. GATTTAGAGC TTGACGGGGA. AAGCCGGCGA 680 ACGTGCCGAG AAAGGAAGGG

AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG 720 CGCTAGGGCG CTGGCAAGTG TAGCGGTCAC GCTGCGCGTA 760 ACCA.
CCACAC CCGCCGCGCT TAATGCGCCG. CTACAGGGCG 800 CGTACTATGG. TTGCTTTGAC GAGCACGTAT.
AACGTGCTTT 840 CCTCGTTGGA. ATCAGAGCGG GAGCTAAACA. GGAGGCCGAT 880 TAAAGGGATT.
TTAGACAGGA ACGGTACGCC. AGAATCTTGA 920 GAAGTGTTTT. TATAATCAGT GAGGCCACCG.
AGTAAAAGAG 960 TCTGTCCATC. ACGCAAATTA ACCGTTGTAG. CAATACTTCT 1000 TTGATTAGTA.
ATAACATCAC TTGCCTGAGT. AGAAGAACTC 1040 AAACATATCGG. CCTTGCTGGT AATATCCAGA.
ACAATATTAC 1080 CGCCAGCCAT. TGCAACAGGA AAAACGCTCA TGGAAATACC 1120 TACATTTTGA
CGCTCAATCG TCTGAAATGG ATTATTTACA 1160 TTGGCAGATT CACCAGT. CAC ACGACCAGTA
ATAAAAGGGA 1200 CATTCTGGCC AACAGAG 1217[0150](2) array number: -- information [on two]: -- feature:
(A) length [of (i) arrangement]: -- 18 nucleotide (B) type: -- number [of nucleic acid (C) chains]: -- single strand
(D) topology: -- straight-chain-shape (xi) arrangement: -- array number: -- 2TGTAACCGA CGGCCAGT 18

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Ornamentation of the carboxy substituent of the energy transfer coloring matter to activated N-hydroxy succinimidyl (NHS) ester (this generates the oligonucleotide primer by which ranked second, was made to react to aminoethyl-oligomer and the coloring matter sign was carried out) is shown.

[Drawing 2] The fluorescence discharge strength of a series of energy transfer coloring matter of this invention is compared with other energy transfer coloring matter and an acceptor pigment independent.

[Drawing 3] Some especially desirable embodiments of the 4,7-dichloro rhodamine pigment compound which can be used into the energy transfer coloring matter of this invention are shown.

[Drawing 4] Some especially desirable embodiments of the 4,7-dichloro rhodamine pigment compound which can be used into the energy transfer coloring matter of this invention are shown.

[Drawing 5] The generalized desirable synthetic scheme of preparation of the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter (substituent X_1 may be except carboxylate) of this invention is shown.

[Drawing 6] The generalized desirable synthetic scheme of preparation of the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter (substituent X_1 is carboxylate) of this invention is shown.

[Drawing 7] The group of four sorts of coloring matter (the 3-carboxy- R110, the 5-carboxy- R6G, 5 TMR-B-CF, and 5 ROX-CF) which can be disassembled in spectrum is shown mutually.

[Drawing 8] The group of four sorts of coloring matter (the 3-carboxy- R110, the 5-carboxy- R6G, 5 ROX-CF, and Cy5-CF) which can be disassembled in spectrum is shown mutually.

[Drawing 9] It is the plot of the mixture of an oligonucleotide which was generated during coloring matter primer sequencing which uses the primer by which 5 TMR-CF sign was carried out, and the primer by which 5 TMR-B-CF sign was carried out and by which the sign was carried out.

[Drawing 10] It is 4 color plot of coloring matter primer sequencing which uses the group of four coloring matter containing the 3-carboxy- R110, the 5-carboxy- R6G, 5 TMR-CF, and 5 TMR-B-CF.

[Drawing 11] The spectrum with which the spectrum and 5-CFB-DR6G-2 with which 6-CFB-DR 110-2 and DR110-2 lapped, and DR6G-2 lapped is shown.

[Drawing 12] The spectrum with which the spectrum and 6-CFB-DROX-2 with which 6-CFB-DTMR-2 and DTMR-2 lapped, and DROX-2 lapped is shown.

[Drawing 13] The group of four sorts of coloring matter (5-CFB-DR 110-2 and 5 CFB-DR6G-2, 6-CFB-DTMR-2, and 6-CFB-DROX-2) which can be disassembled in spectrum is shown mutually.

[Drawing 14] It is the plot of the mixture of an oligonucleotide which was generated during coloring matter primer sequencing which uses the primer by which the 6-CFB-DTMR-2 sign was carried out, and the primer by which the DTMR-2 sign was carried out and by which the sign was carried out.

[Drawing 15] It is the plot of the mixture of an oligonucleotide which was generated during coloring matter primer sequencing which uses the primer by which the 5-CF-TMR-2 sign was carried out, and the primer by which the 5-CF-B-TMR-2 sign was carried out and by which the sign was carried out.

[Drawing 16] It is 4 color plot of coloring matter primer sequencing which uses the group of four sorts of coloring matter containing 5-CFB-DR 110-2 and 6-CFB-DR6g-2, 5-CFB-DTMR-2, and 5-CFB-DROX-2.

[Drawing 17] It is 4 color plot of coloring matter primer sequencing which uses the group of four sorts of coloring matter containing 5-CFB-DR 110-2 and 6-CFB-DR6g-2, 5-CFB-DTMR-2, and 5-CFB-DROX-2.

[Translation done.]

NOTICES

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CORRECTION OR AMENDMENT

[Kind of official gazette]Printing of amendment by regulation of Patent Law Article 17 of 2
[Section Type] The 3rd Type of the part III gate
[Publication date]Heisei 11(1999) (1999) June 15

[Publication No.]JP,10-88124,A
[Date of Publication]Heisei 10(1998) (1998) April 7
[Annual volume number] Publication of patent applications 10-882
[Application number]Japanese Patent Application No. 9-115920
[International Patent Classification (6th Edition)]

C09K 11/06

G01N 33/533

[FI]

C09K 11/06 Z

G01N 33/533

[Written Amendment]

[Filing date]Heisei 10(1998) March 4

[Amendment 1]

[Document to be Amended]Description

[Item(s) to be Amended]Claims

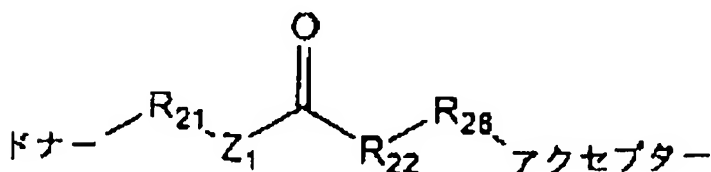
[Method of Amendment]Change

[Proposed Amendment]

[Claim(s)]

[Claim 1]A structural formula

[Formula 1]



(Inside of a formula)

It is coloring matter which a donor absorbs the light of the first wave, and can answer and can release excitation energy.

It is coloring matter which an acceptor absorbs excitation energy released with donor coloring matter, and can answer and can show a fluorescence by secondary wave length,

Z₁ is chosen from a group which consists of NH, sulfur, and oxygen,

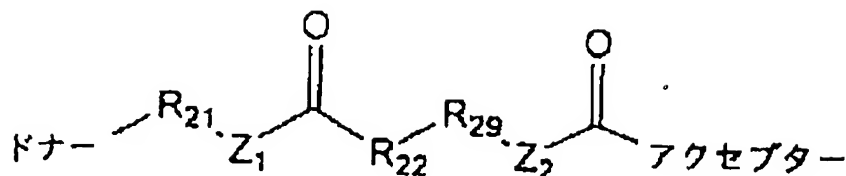
R₂₁ is the C₁₋₅ alkyl combined with donor coloring matter,

R₂₂ is a substituent containing a functional group chosen from a group which consists of condensed ring structure combined with a five-membered ring which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond and six membered-rings, or carbonyl carbons, and a functional group to which R₂₈ combines a linker with an acceptor pigment — containing -- energy transfer coloring matter which it has.

[Claim 2]R₂₂ Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, Cyclohexadiene, a franc, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, Isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, The energy transfer coloring matter according to claim 1 including a five-membered ring or six membered-rings which were chosen from a group which consists of pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene.

[Claim 3]Coloring matter is a structural formula.

[Formula 2]

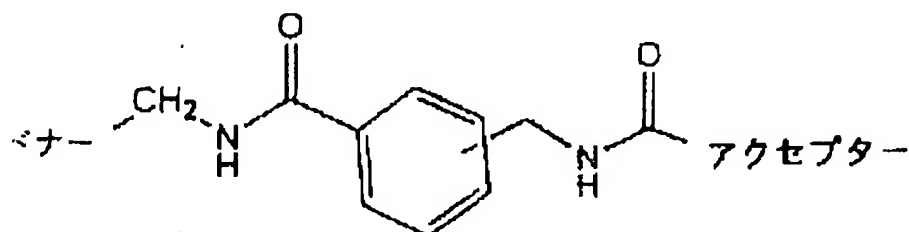


(Inside of a formula)

Z_2 is chosen from the group which consists of NH, sulfur, and oxygen -- and R_{29} -- C_{1-5} alkyl -- it is -- the energy transfer coloring matter according to claim 1 which it has.

[Claim 4] Coloring matter is a structural formula.

[Formula 3]



The energy transfer coloring matter according to claim 1 which ****.

[Claim 5] The energy transfer coloring matter according to claim 1 whose donor coloring matter is a member of a xanthene class of coloring matter.

[Claim 6] The energy transfer coloring matter according to claim 5 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 7] The energy transfer coloring matter according to claim 1 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which donor coloring matter becomes from fluorescein dye, rhodamine coloring matter, and an unsymmetrical benzo xanthene pigment.

[Claim 8] The energy transfer coloring matter according to claim 7 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

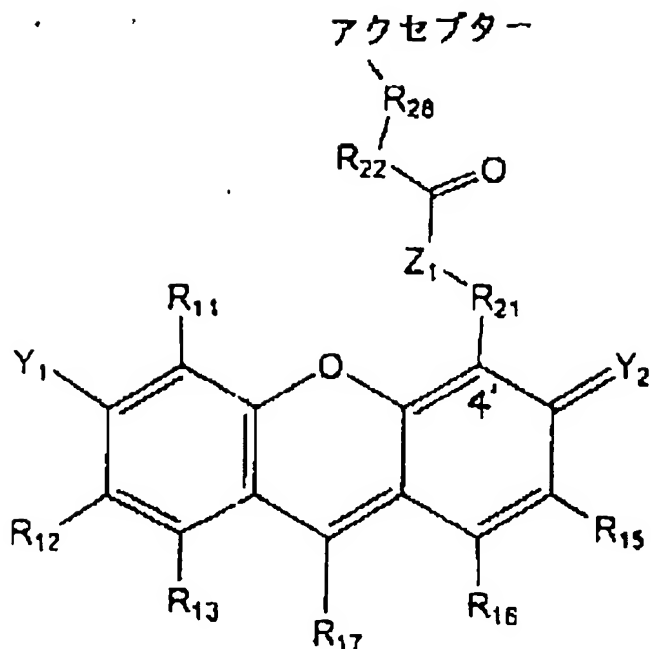
[Claim 9] Donor coloring matter Carboxyfluorescein, 4, 7-dichlorofluorescein coloring matter, The energy transfer coloring matter according to claim 1 chosen from a group which consists of an unsymmetrical benzo xanthene pigment, a rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, and the carboxy R6G.

[Claim 10] An acceptor pigment 4,7-dichlorofluorescein coloring matter, an unsymmetrical benzo xanthene pigment, A rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, The energy transfer coloring matter according to claim 1 chosen from a group which consists of a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, the carboxy R6G, a carboxy-X-rhodamine, and Cy5.

[Claim 11] The energy transfer coloring matter according to claim 1 in which an acceptor pigment is chosen from a group which consists of DR110-2, DR6G-2, DTMR, and DROX.

[Claim 12] A structural formula

[Formula 4]



(Inside of a formula)

Y_1 and Y_2 are chosen from the group which consists of hydroxyl, oxygen, iminium, and amine independently, respectively,

Z_1 is chosen from the group which consists of NH, sulfur, and oxygen,

Independently R_{11} - R_{13} and R_{15} - R_{17} , respectively Hydrogen, It is chosen out of the group which consists of such combination, when fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring,

R_{21} is C_{1-5} alkyl,

R_{22} is a substituent containing the functional group chosen from the group which consists of condensed ring structure combined with the five-membered ring which has an alkene, diene, an alkyne, and at least one unsaturated bond and six membered-rings, or carbonyl carbons, the coloring matter which can absorb the excitation energy with which the acceptor was emitted by the member of the xanthene class of coloring matter including the functional group to which R_{28} combines a linker with an acceptor pigment — it is — the energy transfer coloring matter which it has.

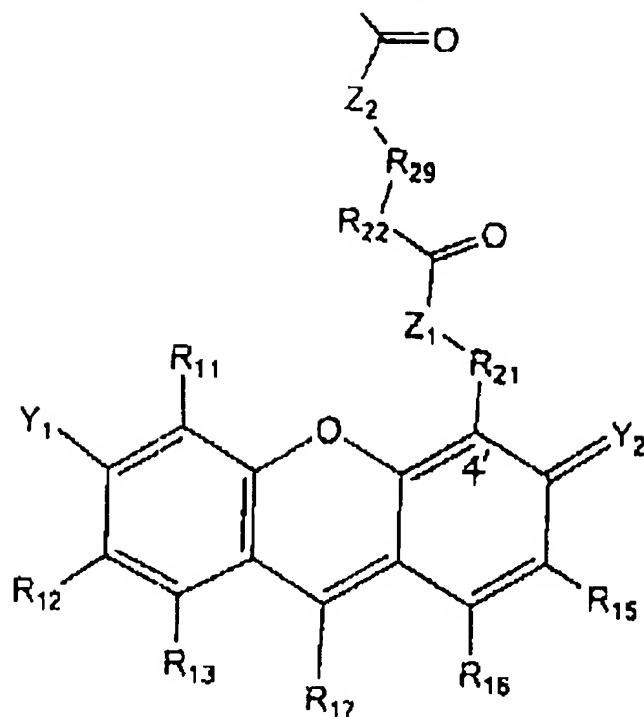
[Claim 13] R_{22} Cyclopentene, a cyclohexene, a cyclopentadiene, Cyclohexadiene, a franc, thiofuran, pyrrole,

isopyrrole, Isoazole, a pyrazole, isoimidazole, Piran, a pyrone, benzene, The energy transfer coloring matter according to claim 12 which is a five-membered ring or six membered-rings which were chosen from a group which consists of pyridine, pyridazine, pyrimidine, PURAJIN oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, Indore, and naphthalene.

[Claim 14] Coloring matter is a structural formula.

[Formula 5]

アクセプター



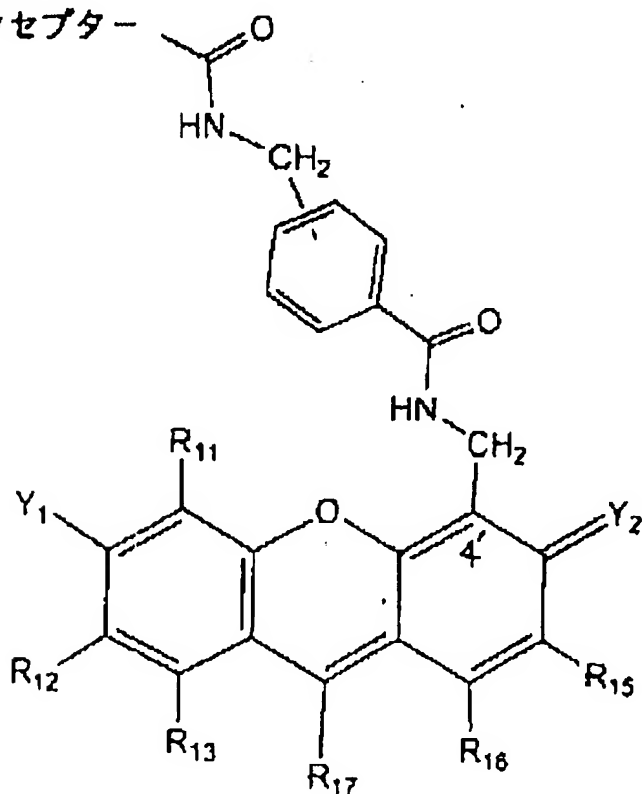
(Inside of a formula)

Z_2 is chosen from the group which consists of NH, sulfur, and oxygen --- and R_{29} --- C_{1-5} alkyl --- it is --- the energy transfer coloring matter according to claim 12 which it has.

[Claim 15] Coloring matter is a structural formula.

[Formula 6]

アクセプター



The energy transfer coloring matter according to claim 12 which ****.

[Claim 16] The energy transfer coloring matter according to claim 12 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 17] The energy transfer coloring matter according to claim 12 which is a member of a class of coloring matter

chosen from a group which donor coloring matter becomes from fluorescein dye, rhodamine coloring matter, and an unsymmetrical benzo xanthene pigment.

[Claim 18]The energy transfer coloring matter according to claim 17 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

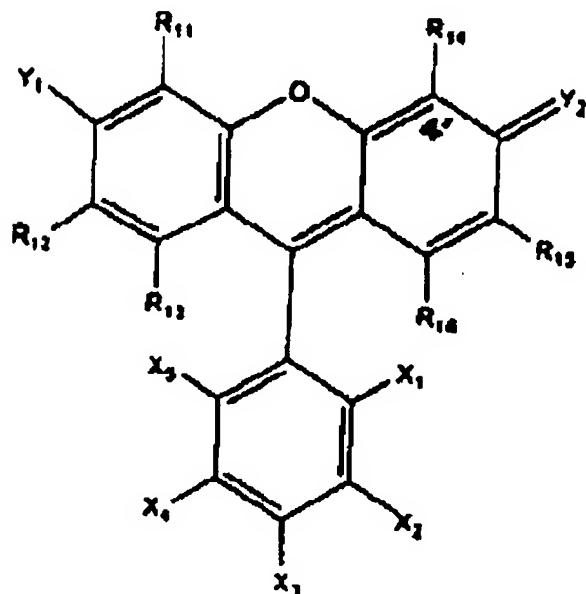
[Claim 19]Donor coloring matter Carboxyfluorescein, 4, 7-dichlorofluorescein coloring matter, The energy transfer coloring matter according to claim 12 chosen from a group which consists of an unsymmetrical benzo xanthene pigment, a rhodamine, a carboxy rhodamine, a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, and the carboxy R6G.

[Claim 20]The energy transfer coloring matter according to claim 19 which is a member of a class of coloring matter chosen from a group which an acceptor pigment becomes from a xanthene pigment, cyanine dye, phthalocyanine dye, and squaraine coloring matter.

[Claim 21]An acceptor pigment 4,7-dichlorofluorescein coloring matter, an unsymmetrical benzo xanthene pigment, A rhodamine, 4,7-dichloro rhodamine coloring matter, a carboxy rhodamine, The energy transfer coloring matter according to claim 12 chosen from a group which consists of a N,N,N',N'-tetramethyl carboxy rhodamine, the carboxy R110, the carboxy R6G, a carboxy-X-rhodamine, and Cy5.

[Claim 22]An acceptor is a general structural formula.

[Formula 7]



(Inside of a formula)

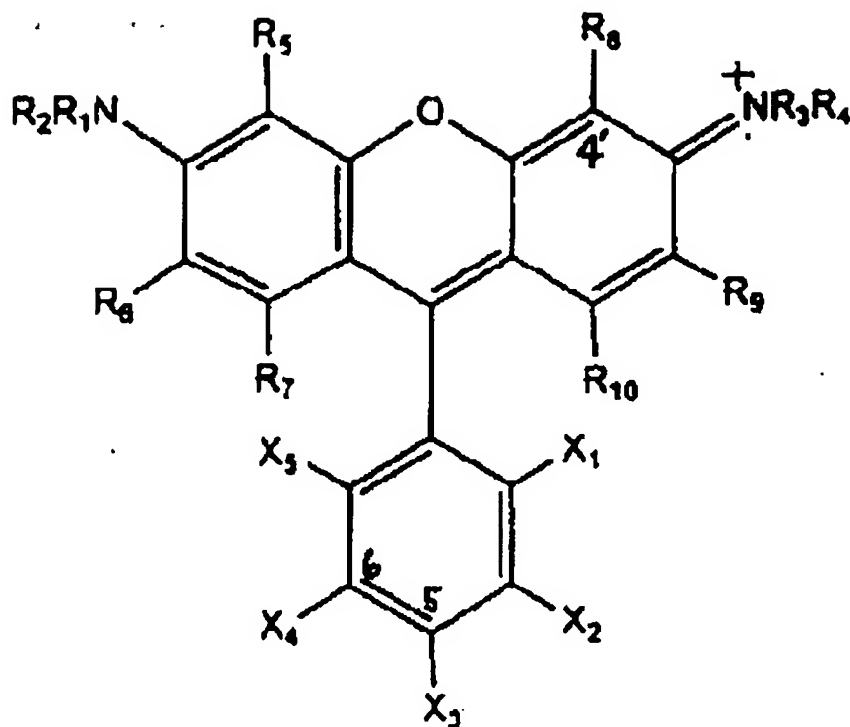
Y₁ and Y₂ are chosen from the group which consists of hydroxyl, oxygen, iminium, and amine independently, respectively.

Independently R₁₁ - R₁₆, respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, It is chosen out of the group which consists of such combination, when carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a contiguity substituent are mixed and form a ring,

Independently X₁ - X₅, respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, Carboxyl, alkyl, alkene, alkyne, sulfonate, and amino **, when ammonium, amide, nitril, and an alkoxy ** contiguity substituent are mixed and form a ring, it is chosen out of a group which consists of such combination, and one of X₃ and the X₄ is combined with an R₂₈ group — **** — the energy transfer coloring matter according to claim 12 which it has.

[Claim 23]An acceptor pigment is a general structural formula.

[Formula 8]



(Inside of a formula)

$R_1 - R_4$ are chosen from the group which consists of hydrogen and alkyl independently, respectively, or are made together [the basis of R_1 , R_5 and R_2 , R_6 and R_3 , R_8 and R_4 and R_9] by one or more, and form a ring,

Independently $R_5 - R_{10}$, respectively Hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, It is chosen out of the group which consists of carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, a sulfone, amino ** ammonium, amide, nitril, alkoxy ** phenyl, and substituted phenyl, or it is made together [$R_5 - R_{10}$] by two or more, and one or more rings are formed,

X_1 , X_3 , and X_4 are independently chosen from hydrogen, fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate, a sulfone, amino ** ammonium, amide, nitril, or a group, alkoxy ** and others, respectively, X_2 and X_5 are chlorine, and one of X_3 and the X_4 is combined with R_{28} — **** — the energy transfer coloring matter according to claim 12 which it has.

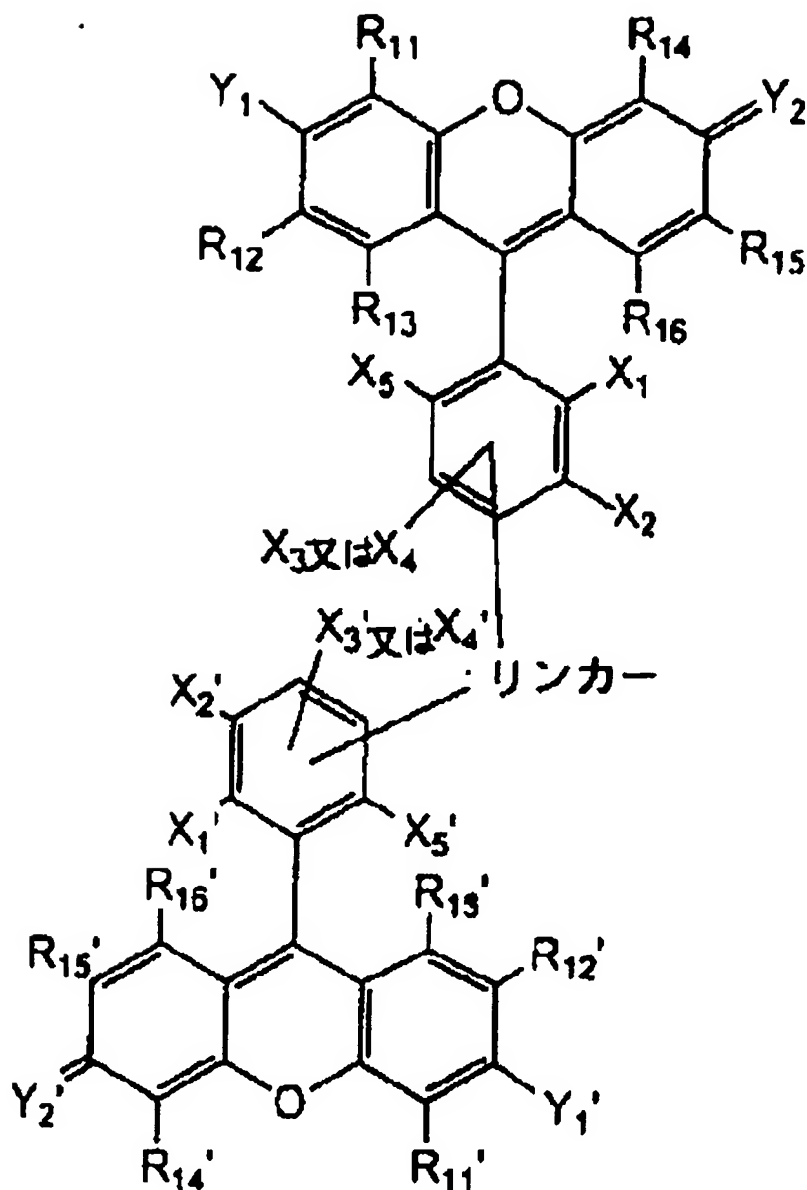
[Claim 24]The energy transfer coloring matter according to claim 23 whose ring formed of substituent $R_5 - R_{10}$ is a five-membered ring, six membered-rings, or seven membered-rings.

[Claim 25]The energy transfer coloring matter according to claim 23 which is made together [a basis of R_1 , R_5 and R_2 , R_6 and R_3 , R_8 and R_4 , and R_9] by one or more, and forms a five-membered ring, six membered-rings, or seven membered-rings.

[Claim 26]The energy transfer coloring matter according to claim 23 chosen so that $R_1 - R_{10}$, X_1 , X_3 , and X_4 may be equivalent to coloring matter chosen from a group which consists of DR110-2, DR6G-2, DTMR-2, and DROX-2.

[Claim 27]A general structural formula

[Formula 9]



(Inside of a formula)

Y --- one --- Y --- one --- Y --- two --- and --- Y --- two --- respectively independent
 --- hydroxyl --- oxygen --- iminium --- amine --- from --- becoming --- a group --- from --- choosing --- having
 Independently R_{11} - R_{16} and R_{11}' - R_{16}' , respectively Hydrogen, Fluoride, chlorine, bromine, iodine, carboxyl, alkyl, an
 alkene, An alkyne, sulfonate, amino ** ammonium, amide, nitril, When alkoxy ** phenyl, substituted phenyl, and a
 contiguity substituent are mixed and form a ring, It is chosen out of the group which consists of such combination,
 and independently X_1 - X_5 and X_1' - X_5' , respectively And hydrogen, It is chosen out of the group which consists of
 such combination, when fluoride, chlorine, bromine, YOUKARUBOKISHIRU, alkyl, an alkene, an alkyne, sulfonate,
 amino ** ammonium, amide, nitril, and an alkoxy ** contiguity substituent are mixed and form a ring,
 It is chosen so that it may be equivalent to donor coloring matter which Y_1 , Y_2 , R_{11} - R_{16} and X_1 - X_5 absorb light of
 the first wave, and can answer and can release excitation energy,

Y --- one --- Y --- two --- R --- 11 --- R --- 16 --- and --- X --- one --- X
 --- five --- donor coloring matter ***** energy --- absorbing. It is chosen so that it may be
 equivalent to an acceptor pigment which can answer and can show a fluorescence by secondary wave length, and ---
 X --- three --- and --- X --- four --- one --- a ** --- and --- X --- three --- and --- X --- four ---
 --- one --- a ** --- together --- carrying out --- having --- energy --- a donor --- from --- an acceptor pigment ---
 transferring --- having --- as --- a donor --- an acceptor pigment --- joining together --- a linker --- forming --- an
 energy transfer fluorochrome which it has.

[Claim 28] The energy transfer coloring matter according to claim 27 which has a main chain (this is less than nine
 atoms in length) with which a linker combines a donor with an acceptor.

[Claim 29] A linker is general formula $R_{25}Z_3C(O)$ (among a formula, by a X_3 and X_4 substituent, R_{25} is the C_{1-4}
 alkyl combined with donor coloring matter, and). Z_3 is NH, O is S, and C (O) is a carbonyl group --- and an end

carbonyl group -- X_3' or X_4' -- it is combined with an acceptor pigment by a substituent -- **** -- the NERUGI transition coloring matter according to claim 27 which it has.

[Claim 30] A linker is general formula $R_{25}Z_3C(O)$ (among a formula). $R_{26}Z_4C(O)$ It is the C_{1-4} alkyl combined with donor coloring matter by a $**X_3$ or X_4 substituent, Are $R_{26}C_{1-4}$ alkyl and independently Z_3 and Z_4 , respectively NH, O or S -- it is -- it is a carbonyl group -- and an end carbonyl group -- X_3' or X_4' -- it is combined with APUTA coloring matter by a substituent -- **** -- the energy transfer coloring matter according to claim 27 which it has.

[Claim 31] 5 or 6 carboxy TMR-B-CF, 5, or 6 carboxy TMR-F-CF, 5 or 6 carboxy TMR-P-CF, 5, or 6 carboxy TMR-P-CF, 5 or 6 carboxy TMR-A-CF, 5, or 6 carboxy TMR-D-CF, 5 or 6 carboxy TMR-N-CF, 5, or 6 carboxy ROX-CF, CY5-CF, 5 or 6 carboxy TMR-gly-5AMF and 5, or 6 carboxy TMR-5AMF, An energy transfer fluorochrome chosen from a group which consists of 5 or 6 carboxy CF-B-TMR-2, 5 or 6 carboxy CFB-DR 110-2, 5 or 6 carboxy CFB-DR6g-2 and 5, or 6 carboxy CFB-DROX-2.

[Claim 32] A reagent labeled fluorescently, comprising:

A reagent chosen from a group which consists of a nucleoside, nucleoside monophosphate, nucleoside diphosphate, nucleoside triphosphate, an oligonucleotide, and an oligonucleotide analog which were embellished so that it might be combined with an energy transfer fluorochrome.

An energy transfer fluorochrome given in any 1 paragraph of Claims 1-31.

[Claim 33] The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which a reagent becomes from a guanine deoxyriboside, guanine deoxyriboside monophosphate, guanine deoxyriboside diphosphate, and guanine deoxyriboside triphosphate and which was labeled fluorescently.

[Claim 34] The reagent according to claim 33 which is chosen from a group which a deoxy nucleotide becomes from deoxy cytosine, a deoxyadenosine, deoxyguanosine, and a deoxythymidine and which was labeled fluorescently.

[Claim 35] The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which a reagent becomes from a dideoxy nucleoside, dideoxy nucleoside monophosphate, dideoxy nucleoside diphosphate, and dideoxy nucleoside triphosphate and which was labeled fluorescently.

[Claim 36] The reagent according to claim 32 which is chosen from a group which a deoxy nucleotide becomes from deoxy cytosine, a deoxyadenosine, deoxyguanosine, and a deoxythymidine and which was labeled fluorescently.

[Claim 37] The reagent according to claim 32 whose reagent is an oligonucleotide and which was labeled fluorescently.

[Claim 38] The reagent according to claim 37 which has a three-dash terminal extensible when an oligonucleotide uses polymerase and which was labeled fluorescently.

[Claim 39] A nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, A mixture of a primer by which the sign was carried out extended by forming an oligonucleotide primer and a hybrid which were labeled fluorescently at least under existence of a kind of dideoxy nucleoside triphosphate and DNA polymerase is generated (the DNA polymerase). A primer is extended by guanine deoxyriboside triphosphate until dideoxy nucleoside triphosphate which stops extension of a primer is taken in,

It is the sequencing method of a nucleic acid sequence including determining arrangement of a nucleic acid sequence by separating an extended mixture of a primer and carrying out fluorometry of the generated mixture of a primer which was extended,

It is an oligonucleotide array of complementarity in a part of nucleic acid sequence which sequencing of the oligonucleotide primer labeled fluorescently is carried out, and has a three-dash terminal extensible by polymerase, This method of containing an energy transfer fluorochrome of a description in any 1 paragraph of Claims 1-32 combined with an oligonucleotide.

[Claim 40] A nucleic acid sequence Guanine deoxyriboside triphosphate, A mixture of a primer extended by forming a primer and a hybrid at least under existence of a kind of dideoxy nucleoside triphosphate labeled fluorescently and DNA polymerase is generated (the DNA polymerase). A primer is extended by guanine deoxyriboside triphosphate until it is taken into a primer by which dideoxy nucleoside triphosphate which stops extension of a primer, and which was labeled fluorescently was extended,

It is the sequencing method of a nucleic acid sequence including determining arrangement of a nucleic acid sequence by detecting a dideoxy nucleotide which was combined with a mixture in which an extended mixture of a primer was separated and an extended primer was separated and which was labeled fluorescently,

Dideoxy nucleoside triphosphate labeled fluorescently is dideoxy nucleoside triphosphate,

This method of containing an energy transfer fluorochrome of a description in any 1 paragraph of Claims 1-32 combined with dideoxy nucleoside triphosphate.

[Amendment 2]

[Document to be Amended] Description

[Item(s) to be Amended] 0008

[Method of Amendment] Change

[Proposed Amendment]

[0008]

[Means for Solving the Problem] This invention relates to a linker for combining donor coloring matter with an acceptor pigment in an energy transfer fluorochrome. This invention relates to an energy transfer fluorochrome which has the reinforced fluorescence. This invention relates to a kit in which the directions for a reagent containing energy transfer coloring matter of this invention, coloring matter, and a reagent, coloring matter, and a reagent are

contained. One linker of this invention for combining donor coloring matter with an acceptor pigment in an energy transfer fluorochrome, General structural-formula $R_{21}Z_1C(O)_{22}R_{28}$ which is explained below (among a formula) R_{21} is the C_{1-5} alkyl combined with donor coloring matter, $C(O)$ is a KABONIRU group and Z_1 is NH, sulfur, or oxygen, R_{22} is the substituent combined with carbonyl carbons containing a functional group chosen from a group which consists of an alkene, diene, an alkyne, a five-membered ring that has at least one unsaturated bond, six membered-rings, or condensed ring structure, and a functional group to which R_{28} combines a linker with an acceptor pigment — containing — it has.

[Amendment 3]

[Document to be Amended]Description

[Item(s) to be Amended]0021

[Method of Amendment]Change

[Proposed Amendment]

[0021]It has the donor coloring matter and the acceptor pigment which ****. Among a formula, Y_1 and Y_2 are made separate, and are hydroxyl, oxygen, iminium, or amine, As for iminium and amine, it is preferred that they are iminium of the third class or amine, and $R_{11}-R_{16}$ are all substituents that are the energy transfer coloring matter and conformity of this invention. this operative condition — if it depends like, it will be explained below — as — a linker — each X_3 substituent of donor coloring matter and an acceptor pigment, and a X_4 substituent — it is preferably combined with the X_3 substituent of donor coloring matter and an acceptor pigment by one. In this embodiment, a linker is short and it is preferred that it is/or hard. It is because it turned out that this increases transition of the energy between donor coloring matter and an acceptor pigment when becoming what.

[Amendment 4]

[Document to be Amended]Description

[Item(s) to be Amended]0088

[Method of Amendment]Change

[Proposed Amendment]

[0088]Drawing 3 and 4 show some additional desirable embodiments of the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter which can be used into the energy transfer coloring matter of this invention. In the compound 3 (A), either R_1 or R_2 is ethyl, Another side is hydrogen, R_3 and R_4 are made separate, and are hydrogen, R_6 is methyl, R_5 and $R_7 - R_{10}$ are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 3 (B), either R_1 or R_2 is ethyl, Another side is hydrogen, R_3 and R_4 are made separate, and are methyl, R_6 is methyl, R_5 and $R_7 - R_{10}$ are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 3 (C), R_1 and R_2 are made separate, and it is methyl, R_3 and R_9 are mixed and form six membered-rings, and R_4 and R_8 are mixed and form six membered-rings, R_5 , R_6 , R_7 , and R_{10} are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 4 (D), R_1 and R_2 are made separate, and it is hydrogen, R_3 and R_9 are mixed and form six membered-rings, and R_4 and R_8 are mixed and form six membered-rings, R_5 , R_6 , R_7 , and R_{10} are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 4 (E), either R_1 or R_2 is ethyl, Another side is hydrogen, and R_3 and R_9 are mixed and form six membered-rings, R_4 and R_8 are mixed, and form six membered-rings, R_6 is methyl, R_5 , R_7 , and R_{10} are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen. In the compound 4 (F), R_1 and R_2 are made separate, and it is hydrogen, R_3 and R_4 are made separate, and are methyl, $R_5 - R_{10}$ are made separate, and are hydrogen, X_1 is carboxylate, either X_3 or X_4 is bond groups, and another side is hydrogen.

[Amendment 5]

[Document to be Amended]Description

[Item(s) to be Amended]0089

[Method of Amendment]Change

[Proposed Amendment]

[0089]Drawing 5 and 6 show the generalized desirable synthetic scheme of preparation of the 4,7-dichloro rhodamine coloring matter used into the energy transfer coloring matter of this invention. The variable substituent shown in each figure is as having defined previously. Drawing 5 shows the generalized composition which substituent X_1 is except carboxylate, and obtains. X' shows among a figure the portion which is a precursor of X_1 . In the method shown in drawing 5, 3-2-Eq aminophenol derivative 5(A) / 5 (B). For example, 3-dimethylamino phenol is made to react to the 1-Eq dichlorobenzene derivative (C) 5 3, for example, 4-carboxy-, and a 6 dichloro-2-sulfobenzonic acid cyclic anhydride (that is, the X_1' portion of 4c is mixed, and is $-CO-O-SO_2-$).

[Amendment 6]

[Document to be Amended]Description

[Item(s) to be Amended]0090

[Method of Amendment]Change

[Proposed Amendment]

[0090]Subsequently, reagin is heated by 180 ** in strong acid, for example, polyphosphoric acid, or sulfuric acid for 12 hours. The rough coloring matter 5 (D) precipitates by addition to water, and isolates by centrifugal separation. In order to generate symmetrical output, the reagin 5 (A) and the substituent of 5 (B) are the same, but in order to generate unsymmetrical output, substituents differ. Drawing 6 shows the generalized composition whose substituent X_1 is carboxylate. 2-Eq 3-aminophenol derivative 6(A) / 6(B)(for example, 3)-dimethylamino phenol is made to react to the 1-Eq phthalic anhydride derivative 6 (E), for example, 3,6-dichloro trimellitic anhydride, in the method of drawing 6. Subsequently, reagin is heated by 180 ** in strong acid, for example, polyphosphoric acid, or sulfuric acid for 12 hours. The rough coloring matter 6 (D) precipitates by addition to water, and isolates by centrifugal separation. In order to generate symmetrical output, the reagin 6 (A) and the substituent of 6 (B) are the same, but in order to generate unsymmetrical output, substituents differ.

2. Energy transfer coloring matter containing 4,7-dichloro rhodamine as acceptor

The donor coloring matter which the energy transfer coloring matter of this invention absorbs the light of the first wave, and answers and generally releases excitation energy, The linker which forms in an acceptor pigment the 4,7-dichloro rhodamine acceptor pigment which absorbs the excitation energy released with donor coloring matter, can answer and can show a fluorescence of secondary wave length, and donor coloring matter is included. The desirable example of this class of the coloring matter which uses 4,7-dichloro rhodamine coloring matter as an acceptor pigment is shown in Table 1. Although the coloring matter shown in DR110-2 which was explained previously, DR6G-2, DTMR, DROX, drawing 3, and 4 as an example of the acceptor pigment which can be used into this class of coloring matter is mentioned, it is not limited to these. One subclass of these energy transfer fluorochromes is coloring matter of the first class of the coloring matter of this invention whose acceptor pigment is 4,7-dichloro rhodamine coloring matter. The general structural formula of these coloring matter is shown below.

[Amendment 7]

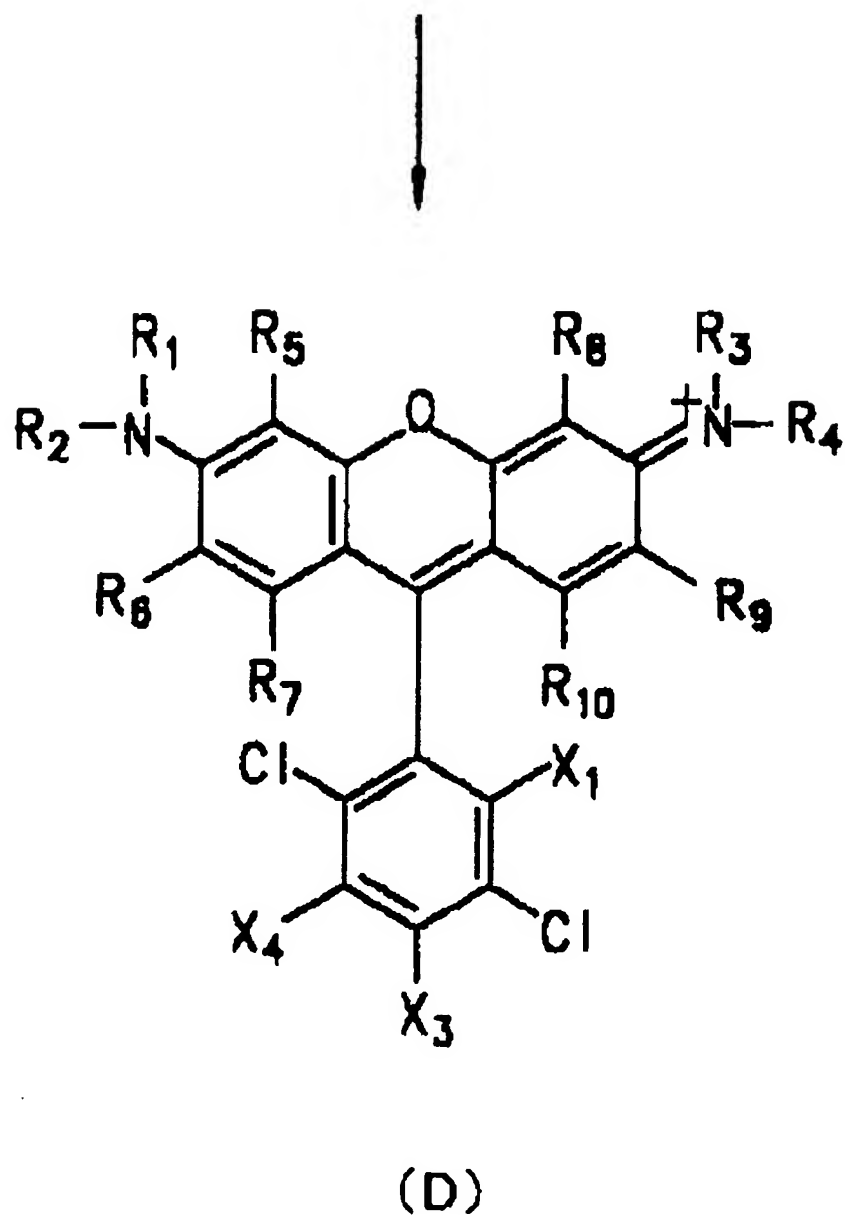
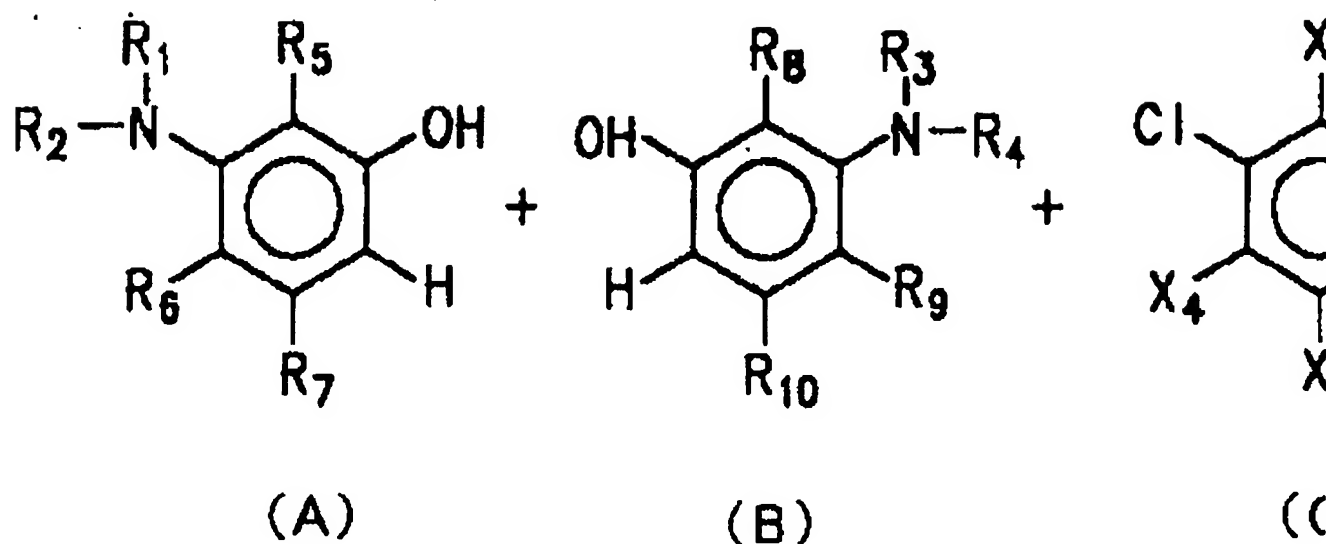
[Document to be Amended]DRAWINGS

[Item(s) to be Amended]Drawing 5

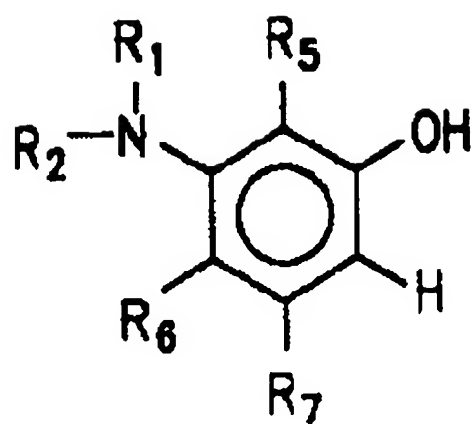
[Method of Amendment]Change

[Proposed Amendment]

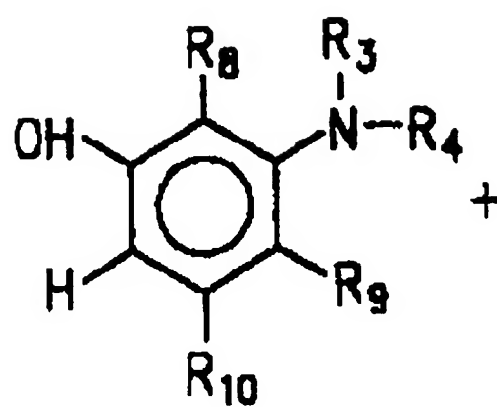
[Drawing 5]



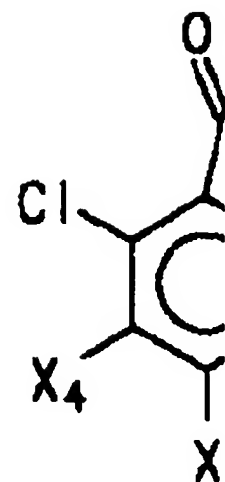
[Method of Amendment]Change
[Proposed Amendment]
[Drawing 6]



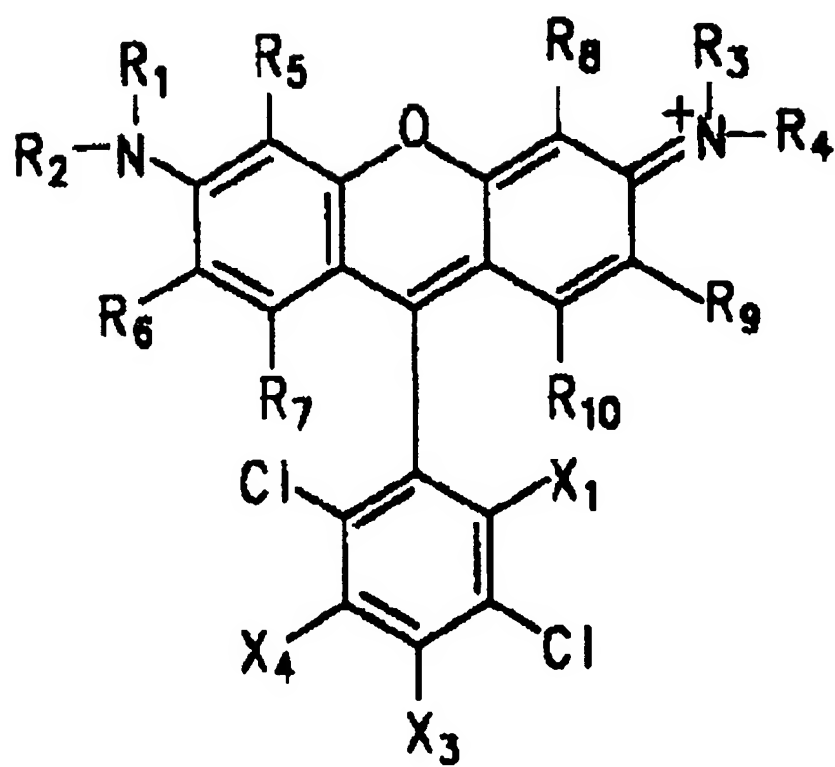
(A)



(B)



(C)



(D)

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-88124

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月7日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 9 K 11/06

C 0 9 K 11/06

Z

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 33/533

審査請求 未請求 請求項の数79 O L (全 61 頁)

(21) 出願番号 特願平9-115920

(22) 出願日 平成9年(1997) 5月6日

(31) 優先権主張番号 08/642330

(32) 優先日 1996年5月3日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 08/726462

(32) 優先日 1996年10月4日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 597062649

パーキン-エルマー コーポレーション

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

94404 フォスター シティ リンカー

ン センター ドライヴ 850 アブライ

ドバイオシステムズ ディヴィジョン

(72) 発明者 リンダ ジー リー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

94303 バロ アルト ステーリング ド

ライヴ 3187

(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増強された蛍光を有するエネルギー転移色素

(57) 【要約】

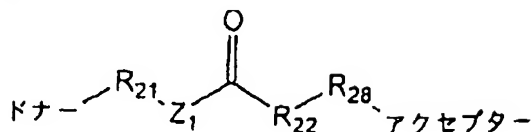
【課題】 エネルギー転移色素中でドナー色素とアクセプター色素間のエネルギーの有効な転移を増進するリンカーを提供することにある。

【解決手段】 一般構造式 $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{23}$ (式中、 R_{21} はドナー色素に結合された C_{1-5} アルキルであり、 $C(O)$ はカルボニル基であり、 Z_1 は NH、硫黄または酸素であり、 R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造を含む置換基であり、かつ R_{23} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む) を有することを特徴とするドナー色素をエネルギー転移蛍光色素中でアクセプター色素に結合するためのリンカー。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 構造式

【化1】



(式中、

ドナーは第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出することができる色素であり、

アクセプターはドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができる色素であり、

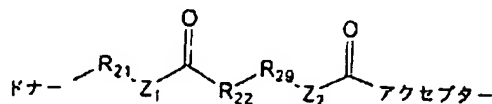
C(O)はカルボニル基であり、

Z₁はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、R₂₁はドナー色素に結合されたC₁₋₅アルキルであり、R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造からなる群から選ばれた置換基であり、かつR₂₈はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む)を有するエネルギー転移色素。

【請求項2】 R₂₂がシクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ビリジン、ビリダジン、ビリミジン、プラジンオキサジン、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール及びナフタレンからなる群から選ばれた5員環または6員環である請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項3】 リンカーが構造式

【化2】

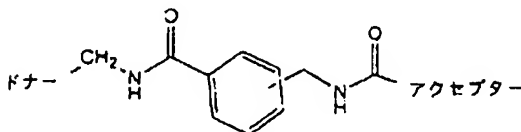


(式中、

Z₂はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、かつR₂₃はC₁₋₅アルキルである)を有する請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項4】 リンカーが構造式

【化3】



を有する請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項5】 ドナー色素が色素のキサンテンクラスの員である請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項6】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項5に記載のエネルギー転移色素。

【請求項7】 ドナー色素がフルオレセイン色素、ローダミン色素及び非対称ベンゾキサンテン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項8】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項7に記載のエネルギー転移色素。

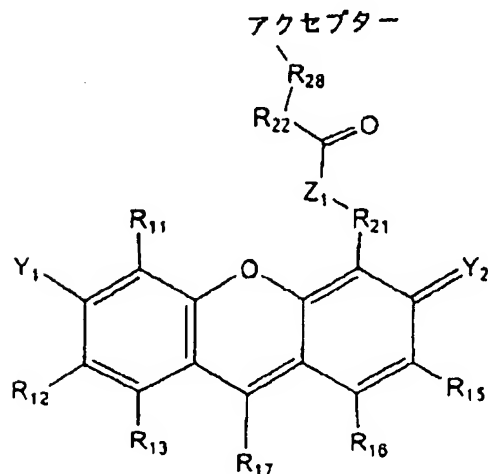
【請求項9】 ドナー色素がカルボキシフルオレセイン、4, 7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、4, 7-ジクロロローダミン色素、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、及びカルボキシR6G からなる群から選ばれる請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項10】 アクセプター色素が4, 7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、4, 7-ジクロロローダミン色素、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、カルボキシR6G、カルボキシ-X-ローダミン及びCy5からなる群から選ばれる請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項11】 アクセプター色素がDR110-2、DR6G-2、DTMR及びDROXからなる群から選ばれる請求項1に記載のエネルギー転移色素。

【請求項12】 構造式

【化4】



(式中、

C(O)はカルボニル基であり、

Y₁及びY₂は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニ

ウム及びアミンからなる群から選ばれ、

Z_1 はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、

$R_{11} \sim R_{17}$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

R_{21} は C_{1-5} アルキルであり、

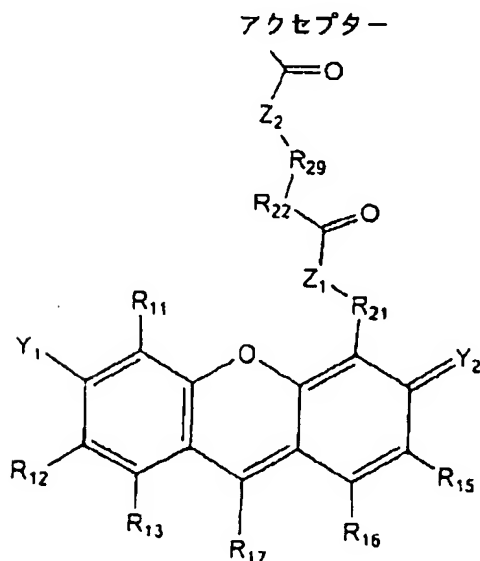
R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造からなる群から選ばれた置換基であり、

R_{28} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含み、かつアクセプターは色素のキサンテンクラスの一員により放出された励起エネルギーを吸収することができる色素である)を有するエネルギー転移色素。

【請求項13】 R_{22} がシクロベンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ビリジン、ピリダジン、ピリミジン、プラジノンオキサジン、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール及びナフタレンからなる群から選ばれた5員環または6員環である請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項14】 色素が構造式

【化5】



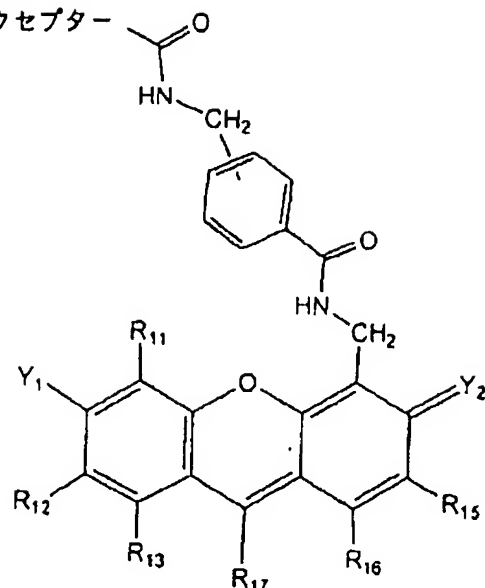
(式中、

Z_2 はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、かつ R_{29} は C_{1-5} アルキルである)を有する請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項15】 リンカーが構造式

【化6】

アクセプター



を有する請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項16】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項17】 ドナー色素がフルオレセイン色素、ローダミン色素及び非対称ベンゾキサンテン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項18】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項17に記載のエネルギー転移色素。

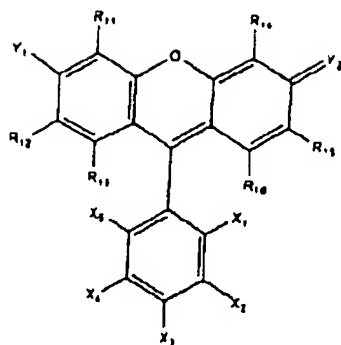
【請求項19】 ドナー色素がカルボキシフルオレセイン、4, 7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、及びカルボキシR6G からなる群から選ばれる請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項20】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項19に記載のエネルギー転移色素。

【請求項21】 アクセプター色素が4, 7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、4, 7-ジクロロローダミン色素、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、カルボキシR6G、カルボキシ-X-ローダミン及びCy5からなる群から選ばれる請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項22】 アクセプターが一般構造式

【化7】



(式中、

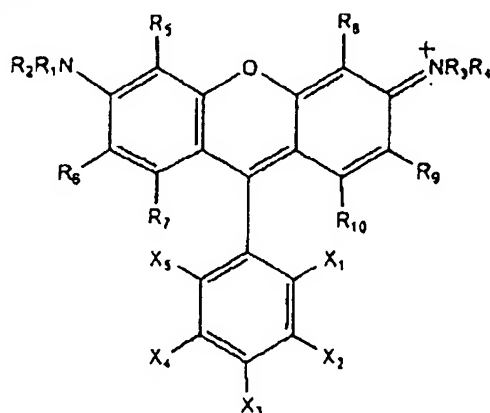
Y_1 及び Y_2 は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニウム及びアミンからなる群から選ばれ、

$R_{11} \sim R_{17}$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

$X_1 \sim X_6$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、かつ X_3 及び X_4 の一つは R_{23} 基に結合されている) を有する請求項12に記載のエネルギー転移色素。

【請求項23】 アクセプター色素が一般構造式

【化8】



(式中、

$R_1 \sim R_4$ は夫々独立に水素、及びアルキルからなる群から選ばれ、または R_1 と R_5 、 R_2 と R_3 、 R_3 と R_4 と R_5 の基の一つ以上と一緒にされて環を形成し、

$R_5 \sim R_{11}$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、及び置換フェニルからなる群から選ばれ、または $R_5 \sim R_{10}$ の二つ以上と一緒にされて一つ以上の環を形成し、

X_1 、 X_3 及び X_4 は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、またはアルコキシからなる群から選ばれ、

X_2 及び X_5 は塩素であり、かつ X_3 及び X_4 の一つは R_{28} に結合されている) を有する請求項12に記載のエネルギー転移色素。

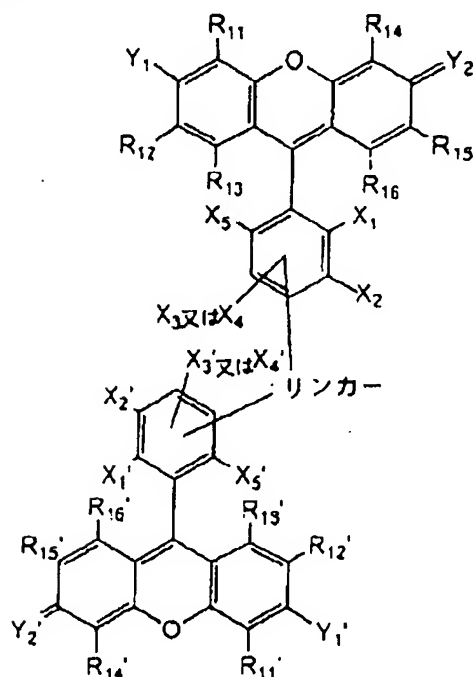
【請求項24】 置換基 $R_5 \sim R_{10}$ により形成された環が5員環、6員環または7員環である請求項23に記載のエネルギー転移色素。

【請求項25】 R_1 と R_5 、 R_2 と R_6 、 R_3 と R_9 、 R_4 と R_9 の基の一つ以上と一緒にされて5員環、6員環または7員環を形成する請求項23に記載のエネルギー転移色素。

【請求項26】 $R_1 \sim R_{10}$ 、 X_1 、 X_3 及び X_4 が DR110-2、DR6G-2、DTMR-2、及び DROX-2 からなる群から選ばれた色素に相当するように選ばれる請求項23に記載のエネルギー転移色素。

【請求項27】 一般構造式

【化9】



(式中、

Y_1 、 Y_3 、 Y_2 及び Y_2' は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニウム及びアミンからなる群から選ばれ、 $R_{11} \sim R_{16}$ 及び $R_{11}' \sim R_{15}'$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、

及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、かつ $X_1 \sim X_3$ 及び $X_1' \sim X_5'$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

Y_1 、 Y_2 、 $R_{11} \sim R_{16}$ 及び $X_1 \sim X_5$ は第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出することができるドナー色素に相当するように選ばれ、

Y_1' 、 Y_2' 、 $R_{11}' \sim R_{16}'$ 及び $X_1' \sim X_5'$ はドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができるアクセプター色素に相当するように選ばれ、かつ X_3 及び X_4 の一つ並びに X_3' 及び X_4' の一つは一緒にされて、エネルギーがドナーからアクセプター色素に転移されるようにドナーをアクセプター色素に結合するリンカーを形成する)を有するエネルギー転移蛍光色素。

【請求項28】 リンカーがドナーをアクセプターに結合する主鎖(これは長さが9原子未満である)を有する請求項27に記載のエネルギー転移色素。

【請求項29】 リンカーが一般式 $R_{25}Z_3C(O)$ (式中、 R_{25} は X_3 または X_4 置換基でドナー色素に結合された C_{1-4} アルキルであり、 Z_3 はNH、OまたはSであり、 $C(O)$ はカルボニル基であり、かつ末端カルボニル基が X_3' または X_4' 置換基でアクセプター色素に結合されている)を有する請求項27に記載のエネルギー転移色素。

【請求項30】 リンカーが一般式 $R_{25}Z_3C(O)R_{26}Z_4C(O)$ (式中、 R_{25} は X_3 または X_4 置換基でドナー色素に結合された C_{1-4} アルキルであり、 R_{26} は C_{1-4} アルキルであり、 Z_3 及び Z_4 は夫々独立にNH、OまたはSであり、 $C(O)$ はカルボニル基であり、かつ末端カルボニル基が X_3' または X_4' 置換基でアクセプター色素に結合されている)を有する請求項27に記載のエネルギー転移色素。

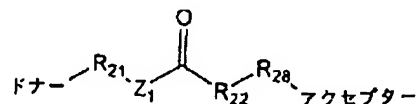
【請求項31】 5または6カルボキシTMR-B-CF、5または6カルボキシTMR-F-CF、5または6カルボキシTMR-P-CF、5または6カルボキシTMR-A-CF、5または6カルボキシTMR-D-CF、5または6カルボキシTMR-N-CF、5または6カルボキシROX-CF、CY5-CF、5または6カルボキシTMR-gly-5AMF及び5または6カルボキシTMR-5AMF、5または6カルボキシCF-B-TMR-2、5または6カルボキシCFB-DR110-2、5または6カルボキシCFB-DR68-2、及び5または6カルボキシCFB-DROX-2からなる群から選ばれたエネルギー転移蛍光色素。

【請求項32】 エネルギー転移蛍光色素に結合されるように修飾された、ヌクレオシド、ヌクレオシドモノホスフェート、ヌクレオシドジホスフェート、ヌクレオシ

ドトリホスフェート、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド類似体からなる群から選ばれた試薬と、試薬に結合されたエネルギー転移蛍光色素とを含む蛍光標識された試薬であって、

エネルギー転移蛍光色素が構造式

【化10】



(式中、

ドナーは第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出することができる色素であり、

アクセプターはドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができる色素であり、

$C(O)$ はカルボニル基であり、

Z_1 はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、

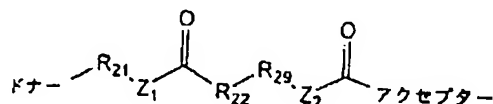
R_{21} はドナー色素に結合された C_{1-5} アルキルであり、

R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造からなる群から選ばれた置換基であり、かつ R_{28} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む)を有する色素を含む蛍光標識された試薬。

【請求項33】 R_{22} がシクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ビリジン、ビリダジン、ビリミジン、プラジンオキサジン、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール及びナフタレンからなる群から選ばれた5員環または6員環である請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項34】 リンカーが構造式

【化11】

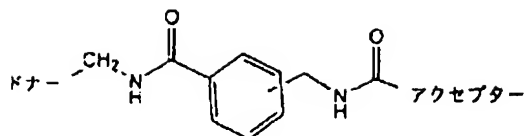


(式中、

Z_2 はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、かつ R_{29} は C_{1-5} アルキルである)を有する請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項35】 リンカーが構造式

【化12】



を有する請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項36】 ドナー色素が色素のキサンテンクラスの一員である請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項37】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項36に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項38】 ドナー色素がフルオレセイン色素、ローダミン色素及び非対称ベンゾキサンテン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項39】 ドナー色素がカルボキシフルオレセイン、4,7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、4,7-ジクロロローダミン色素、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、及びカルボキシR6G からなる群から選ばれた請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項40】 アクセプター色素が4,7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、4,7-ジクロロローダミン色素、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、カルボキシR6G、カルボキシ-X-ローダミン及びCy5からなる群から選ばれた請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項41】 アクセプター色素がDR110-2、DR6G-2、DTMR及びDROXからなる群から選ばれた請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項42】 試薬がデオキシヌクレオシド、デオキシヌクレオシドモノホスフェート、デオキシヌクレオシドジホスフェート及びデオキシヌクレオシドトリホスフェートからなる群から選ばれた請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項43】 デオキシヌクレオチドがデオキシシトシン、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、及びデオキシチミジンからなる群から選ばれた請求項42に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項44】 試薬がジデオキシヌクレオシド、ジデオキシヌクレオシドモノホスフェート、ジデオキシヌクレオシドジホスフェート及びジデオキシヌクレオシドトリホスフェートからなる群から選ばれた請求項32に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項45】 ジデオキシヌクレオチドがデオキシシトシン、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、及びデオキシチミジンからなる群から選ばれた請求項32

に記載の蛍光標識された試薬。

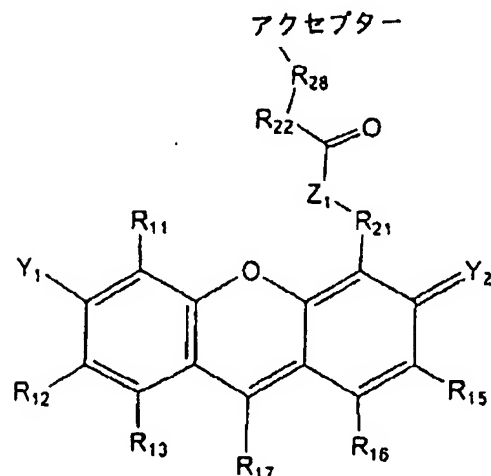
【請求項46】 試薬がオリゴヌクレオチドである請求項42に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項47】 オリゴヌクレオチドがポリメラーゼを使用することにより延長可能である3'末端を有する請求項46に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項48】 エネルギー転移蛍光色素に結合されるように修飾された、ヌクレオシド、ヌクレオシドモノホスフェート、ヌクレオシドジホスフェート、ヌクレオシドトリホスフェート、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド類縁体からなる群から選ばれた試薬と、試薬に結合されたエネルギー転移蛍光色素とを含む蛍光標識された試薬であって、

エネルギー転移蛍光色素が構造式

【化13】



(式中、

C(O)はカルボニル基であり、

Y₁ 及びY₂ は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニウム及びアミンからなる群から選ばれ、

Z₁ はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、

R₁₁~R₁₇は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

R₂₁はC₁₋₅アルキルであり、

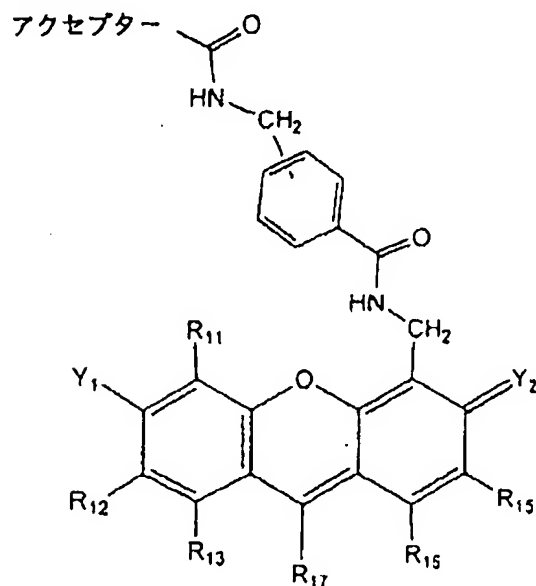
R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造からなる群から選ばれた置換基であり、

R₂₈はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含み、かつアクセプターは色素のキサンテンクラスの一員により放出された励起エネルギーを吸収することができる色素である)を有する色素を含む蛍光標識された試薬。

【請求項49】 R_{22} がシクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ビリジン、ピリダジン、ピリミジン、アラジンオキサジン、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール及びナフタレンからなる群から選ばれた5員環または6員環である請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項50】 色素が構造式

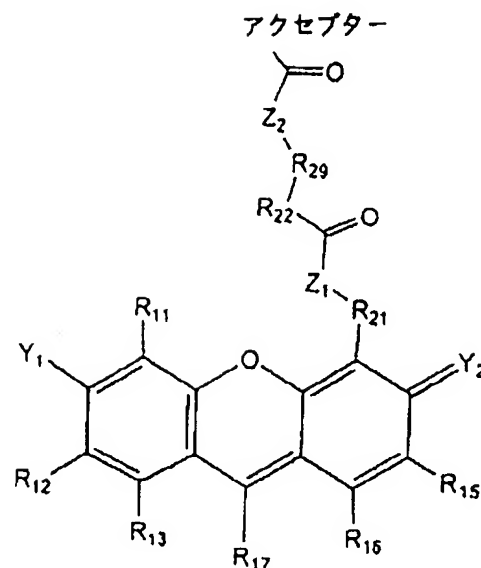
【化14】



(式中、
 Z_2 はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、かつ
 R_{29} は C_{1-5} アルキルである)を有する請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項51】 リンカーが構造式

【化15】



を有する請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項52】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項53】 ドナー色素がフルオレセイン色素、ローダミン色素及び非対称ベンゾキサンテン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

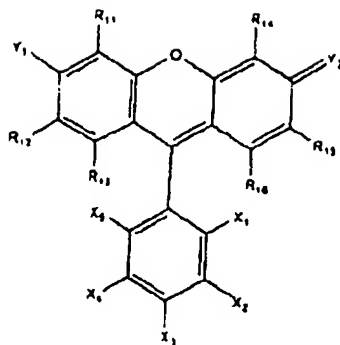
【請求項54】 アクセプター色素がキサンテン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及びスクアライン色素からなる群から選ばれた色素のクラスの一員である請求項53に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項55】 ドナー色素がカルボキシフルオレセイン、4, 7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、及びカルボキシR6G からなる群から選ばれる請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項56】 アクセプター色素が4, 7-ジクロロフルオレセイン色素、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、4, 7-ジクロロローダミン色素、カルボキシローダミン、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン、カルボキシR110、カルボキシR6G、カルボキシ-X-ローダミン及びCy5からなる群から選ばれる請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項57】 アクセプターが一般構造式

【化16】



(式中、

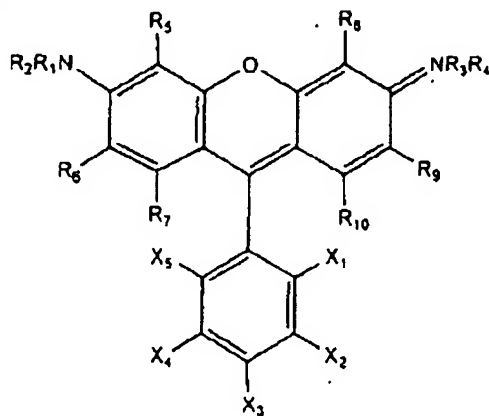
Y_1 及び Y_2 は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニウム及びアミンからなる群から選ばれ、

$R_{11} \sim R_{16}$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基が一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

$X_1 \sim X_5$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、隣接置換基が一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、かつ X_3 及び X_4 の一つは R_{28} 基に結合されている)を有する請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項58】 アクセプター色素が一般構造式

【化17】



(式中、

$R_1 \sim R_4$ は夫々独立に水素、及びアルキルからなる群から選ばれ、または R_1 と R_5 、 R_2 と R_3 、 R_3 と R_7 、 R_1 と R_3 の基の一つ以上が一緒にされて環を形成し、

$R_5 \sim R_{10}$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、及び置換フェニルからなる群から選ばれ、または $R_5 \sim R_{10}$ の二つ以上

が一緒にされて一つ以上の環を形成し、

X_1 、 X_3 及び X_4 は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、またはアルコキシからなる群から選ばれ、

X_2 及び X_5 は塩素であり、かつ X_3 及び X_4 の一つは R_{28} に結合されている)を有する請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項59】 $R_1 \sim R_{10}$ 、 X_1 、 X_3 及び X_4 が DR 110-2、DR6G-2、DTMR-2、及び DROX-2 からなる群から選ばれた色素に相当するように選ばれる請求項58に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項60】 試薬がデオキシヌクレオシド、デオキシヌクレオシドモノホスフェート、デオキシヌクレオシドジホスフェート及びデオキシヌクレオシドトリホスフェートからなる群から選ばれる請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項61】 デオキシヌクレオチドがデオキシシトシン、デオキシアデノシン、デオキシングアノシン、及びデオキシチミジンからなる群から選ばれる請求項60に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項62】 試薬がジデオキシヌクレオシド、ジデオキシヌクレオシドモノホスフェート、ジデオキシヌクレオシドジホスフェート及びジデオキシヌクレオシドトリホスフェートからなる群から選ばれる請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項63】 ジデオキシヌクレオチドがデオキシシトシン、デオキシアデノシン、デオキシングアノシン、及びデオキシチミジンからなる群から選ばれる請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

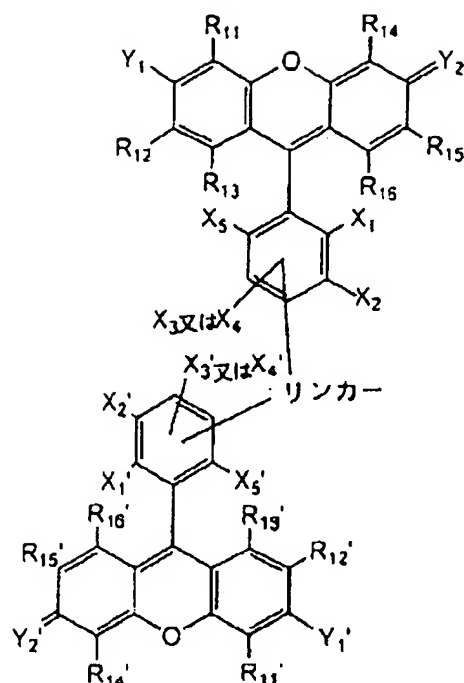
【請求項64】 試薬がオリゴヌクレオチドである請求項48に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項65】 オリゴヌクレオチドがポリメラーゼを使用することにより延長可能である3'末端を有する請求項64に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項66】 エネルギー転移蛍光色素に結合されるように修飾された、ヌクレオシド、ヌクレオシドモノホスフェート、ヌクレオシドジホスフェート、ヌクレオシドトリホスフェート、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド類縁体からなる群から選ばれた試薬と、試薬に結合されたエネルギー転移蛍光色素とを含む蛍光標識された試薬であって、

エネルギー転移蛍光色素が構造式

【化18】



(式中、

Y_1 、 Y_1' 、 Y_2 及び Y_2' は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニウム及びアミンからなる群から選ばれ、 $R_{11} \sim R_{16}$ 及び $R_{11}' \sim R_{16}'$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

$X_1 \sim X_5$ 及び $X_1' \sim X_5'$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

Y_1 、 Y_2 、 $R_{11} \sim R_{16}$ 及び $X_1 \sim X_5$ は第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出することができるドナー色素に相当するように選ばれ、

Y_1' 、 Y_2' 、 $R_{11}' \sim R_{16}'$ 及び $X_1' \sim X_5'$ はドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができるアクセプター色素に相当するように選ばれ、かつ X_3 及び X_4 の一つ並びに X_3' 及び X_4' の一つは一緒にされて、エネルギーがドナーからアクセプター色素に転移されるようにドナーをアクセプター色素に結合するリンカーを形成する)を有する色素を含む蛍光標識された試薬。

【請求項67】 リンカーがドナーをアクセプターに結合する主鎖(これは長さが9原子未満である)を有する請求項66に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項68】 リンカーが一般式 $R_{25}Z_3C(O)R_{26}Z_4C(O)$ (式中、 R_{25} は X_3 または X_4 置換基でドナー色素に結合さ

れた C_{1-4} アルキルであり、 Z_3 は NH 、 O または S であり、 $C(O)$ はカルボニル基であり、かつ末端カルボニル基が X_3' または X_4' 置換基でアクセプター色素に結合されている)を有する請求項66に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項69】 リンカーが一般式 $R_{25}Z_3C(O)R_{26}Z_4C(O)$ (式中、 R_{25} は X_3 または X_4 置換基でドナー色素に結合された C_{1-4} アルキルであり、 R_{26} は C_{1-4} アルキルであり、 Z_3 及び Z_4 は夫々独立に NH 、 O または S であり、 $C(O)$ はカルボニル基であり、かつ末端カルボニル基が X_3' または X_4' 置換基でアクセプター色素に結合されている)を有する請求項66に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項70】 エネルギー転移蛍光色素に結合されるように修飾された、ヌクレオシド、ヌクレオシドモノホスフェート、ヌクレオシジホスフェート、ヌクレオシトリホスフェート、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド類似体からなる群から選ばれた試薬と、試薬に結合されたエネルギー転移蛍光色素とを含む蛍光標識された試薬であって、

エネルギー転移蛍光色素が5または6カルボキシTMR-B-CF、5または6カルボキシTMR-F-CF、5または6カルボキシTMR-P-CF、5または6カルボキシTMR-P-CF、5または6カルボキシTMR-A-CF、5または6カルボキシTMR-D-CF、5または6カルボキシTMR-N-CF、5または6カルボキシROX-CF、CY5-CF、5または6カルボキシTMR-gly-5A-MF及び5または6カルボキシTMR-5AMF、5または6カルボキシCF-B-TMR-2、5または6カルボキシCFB-DR110-2、5または6カルボキシCFB-DR6g-2、及び5または6カルボキシCFB-DROX-2からなる群から選ばれる蛍光標識された試薬。

【請求項71】 試薬がデオキシヌクレオシド、デオキシヌクレオシドモノホスフェート、デオキシヌクレオシジホスフェート及びデオキシヌクレオシトリホスフェートからなる群から選ばれる請求項70に記載の蛍光標識された試薬。

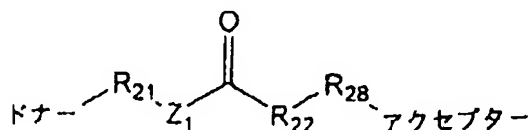
【請求項72】 デオキシヌクレオチドがデオキシシトシン、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、及びデオキシチミジンからなる群から選ばれる請求項71に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項73】 試薬がジデオキシヌクレオシド、ジデオキシヌクレオシドモノホスフェート、ジデオキシヌクレオシジホスフェート及びジデオキシヌクレオシトリホスフェートからなる群から選ばれる請求項70に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項74】 試薬がオリゴヌクレオチドである請求項70に記載の蛍光標識された試薬。

【請求項75】 オリゴヌクレオチドがポリメラーゼを使用することにより延長可能である3'末端を有する請求項74に記載の蛍光標識された試薬。

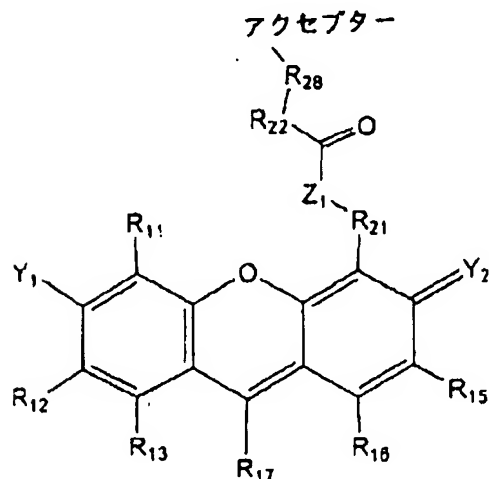
【請求項76】核酸配列をデオキシヌクレオシドトリホスフェート、少なくとも一種のジデオキシヌクレオシドトリホスフェート及びDNAポリメラーゼの存在下で蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリッドを形成することにより延長された標識されたプライマーの混合物を生成し（そのDNAポリメラーゼは、プライマーの延長を終止するジデオキシヌクレオシドトリホスフェートがとり込まれるまでデオキシヌクレオシドトリホスフェートでプライマーを延長する）、延長されたプライマーの混合物を分離し、そして生成された延長されたプライマーの混合物を蛍光測定することにより核酸配列の配列を決定することを含む核酸配列の配列決定方法であって、
 蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーが配列決定され、ポリメラーゼにより延長可能な3'末端を有する核酸配列の一部に相補性のオリゴヌクレオチド配列と、オリゴヌクレオチドに結合されたエネルギー転移蛍光色素とを含み、エネルギー転移蛍光色素が構造式【化19】



(式中、
 ドナーは第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出することができる色素であり、
 アクセプターはドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができる色素であり、
 C(O)はカルボニル基であり、
 Z₁はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、
 R₂₁はドナー色素に結合されたC₁₋₅アルキルであり、
 R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造からなる群から選ばれた置換基であり、かつR₂₈はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む)を有することを特徴とする核酸配列の配列決定方法。

【請求項77】核酸配列をデオキシヌクレオシドトリホスフェート、少なくとも一種のジデオキシヌクレオシドトリホスフェート及びDNAポリメラーゼの存在下で蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリッドを形成することにより延長された標識されたプライマーの混合物を生成し（そのDNAポリメラーゼは、プライマーの延長を終止するジデオキシヌクレオシドトリホスフェートがとり込まれるまでデオキシヌクレオシドトリホスフェートでプライマーを延長する）、延長されたプライマーの混合物を分離し、そして生成された延長されたプライマーの混合物を蛍光測定すること

により核酸配列の配列を決定することを含む核酸配列の配列決定方法であって、
 蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーが配列決定され、ポリメラーゼにより延長可能な3'末端を有する核酸配列の一部に相補性のオリゴヌクレオチド配列と、オリゴヌクレオチドに結合されたエネルギー転移蛍光色素とを含み、エネルギー転移蛍光色素が構造式【化20】



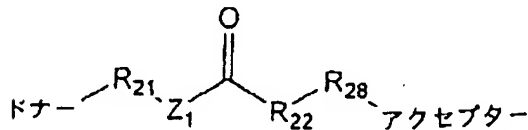
(式中、
 C(O)はカルボニル基であり、
 Y₁及びY₂は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニウム及びアミンからなる群から選ばれ、
 Z₁はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、
 R₁₁~R₁₇は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基が一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、
 R₂₁はC₁₋₅アルキルであり、
 R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造からなる群から選ばれた置換基であり、
 R₂₈はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含み、かつアクセプターは色素のキサンテンクラスの一員により放出された励起エネルギーを吸収することができる色素である)を有することを特徴とする核酸配列の配列決定方法。

【請求項78】核酸配列をデオキシヌクレオシドトリホスフェート、少なくとも一種の蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェート及びDNAポリメラーゼの存在下でプライマーとハイブリッドを形成することにより延長されたプライマーの混合物を生成し（そのDNAポリメラーゼは、プライマーの延長を終止する蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートが

延長されたプライマーにとり込まれるまでデオキシヌクレオシドトリホスフェートでプライマーを延長する)、延長されたプライマーの混合物を分離し、そして延長されたプライマーの分離された混合物に結合された蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドを検出することにより核酸配列の配列を決定することを含む核酸配列の配列決定方法であって、

蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートがジデオキシヌクレオシドトリホスフェートと、ジデオキシヌクレオシドトリホスフェートに結合されたエネルギー転移蛍光色素とを含み、エネルギー転移蛍光色素が構造式

【化21】



(式中、

ドナーは第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出することができる色素であり、

アクセプターはドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができる色素であり、

C(O)はカルボニル基であり、

Z₁ はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、

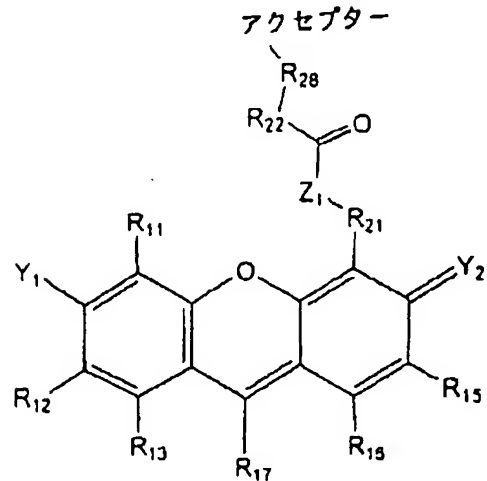
R₂₁はドナー色素に結合されたC₁₋₅アルキルであり、

R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造から選ばれた置換基であり、かつR₂₈はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む)を有することを特徴とする核酸配列の配列決定方法。

【請求項79】核酸配列をデオキシヌクレオシドトリホスフェート、少なくとも一種の蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェート及びDNAポリメラーゼの存在下でプライマーとハイブリッドを形成することにより延長されたプライマーの混合物を生成し(そのDNAポリメラーゼは、プライマーの延長を終止する蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートが延長されたプライマーにとり込まれるまでデオキシヌクレオシドトリホスフェートでプライマーを延長する)、延長されたプライマーの混合物を分離し、そして延長されたプライマーの分離された混合物に結合された蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドを検出することにより核酸配列の配列を決定することを含む核酸配列の配列決定方法であって、

蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートがジデオキシヌクレオシドトリホスフェートと、ジデオキシヌクレオシドトリホスフェートに結合された

エネルギー転移蛍光色素とを含み、その色素が構造式【化22】



(式中、

C(O)はカルボニル基であり、

Y₁ 及びY₂ は夫々独立にヒドロキシル、酸素、イミニウム及びアミンからなる群から選ばれ、

Z₁ はNH、硫黄及び酸素からなる群から選ばれ、

R₁₁~R₁₇は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれ、

R₂₁はC₁₋₅アルキルであり、

R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造からなる群から選ばれた置換基であり、

R₂₈はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含み、かつアクセプターは色素のキサンテンクラスの一員により放出された励起エネルギーを吸収することができる色素である)を有することを特徴とする核酸配列の配列決定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は蛍光色素、更に詳しくは、エネルギー転移蛍光色素及びそれらの使用に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】サンプル中の成分を標識し、検出するための種々の蛍光色素が開発されていた。一般に、蛍光色素は高い量子収量及び大きい吸光係数を有することが好ましく、その結果、色素は少量の検出される成分を検出するのに使用し得る。また、蛍光色素は大きいストークシフト(即ち、色素が最大吸光度を有する波長と色素が最大発光を有する波長

の差)を有することが好ましく、その結果、蛍光発光が色素を励起するのに使用された光源から容易に区別される。開発された蛍光色素の一つのクラスはエネルギー転移蛍光色素である。一般に、エネルギー転移蛍光色素はドナー蛍光体とアクセプター蛍光体とを含む。これらの色素において、ドナー蛍光体とアクセプター蛍光体が互いに接近して、かつ互いに対し適当な配向で位置される場合、ドナー蛍光体からのエネルギー放出がアクセプター蛍光体により吸収され、アクセプター蛍光体に蛍光を発するようにさせる。それ故、励起されたドナー蛍光体はドナー蛍光体の励起エネルギーを有効に吸収し、そのエネルギーをアクセプター蛍光体に有効に転移することができることが重要である。種々のエネルギー転移蛍光色素が文献に記載されていた。例えば、米国特許第4,996,143号及びWO 95/21266は、ドナー蛍光体とアクセプター蛍光体がオリゴヌクレオチド鎖により結合されているエネルギー転移蛍光色素を記載している。Leeら、Nucleic Acids Research 20:10 2471-2483 (1992)はフルオレセインの4'-アミノメチル置換基により4'-アミノメチル-5-カルボキシフルオレセインに結合された5-カルボキシローダミンを含むエネルギー転移蛍光色素を記載している。

【0003】幾つかの診断アッセイ及び分析アッセイが開発されており、これらは蛍光色素を使用するサンプル中の多種成分の検出、例えば、フローサイトメトリー(Lanierら、J.Immunol. 132 151-156 (1984))、染色体分析(Grayら、Chromosoma 739-37(1979))、及びDNA配列決定を伴う。これらのアッセイについて、2種以上のスペクトル的に分解可能な蛍光色素の組を同時に使用することが望ましく、その結果、一種より多い標的物質がサンプル中で同時に検出し得る。多種色素を使用するサンプル中の多種成分の同時検出はサンプル中の個々の成分を連続的に検出するのに必要とされる時間を短縮する。多重遺伝子座DNAプローブアッセイの場合、多種のスペクトル的に分解可能な蛍光色素の使用は必要とされる反応管の数を減少し、それにより実験プロトコルを簡素化し、用途特異性キットの製造を促進する。自動化DNA配列決定の場合、多種のスペクトル的に分解可能な蛍光色素の使用は単一レーン中の4つの塩基の全ての分析を可能にし、それにより単色方法よりも処理量を増大し、レーン内の電気泳動移動度変化と関連する不確定要素を排除する。Connellら、Biotechniques 5 342-348 (1987)、Proberら、Science 238 336-341 (1987)、Smithら、Nature 321 674-679 (1986)、及びAnsongら、Nucleic Acids Research 15 4593-4602 (1989)。

【0004】特に、電気泳動分離及び酵素による処理を必要とする分析、例えば、DNA配列決定について、サンプル中の多種の標的物質を同時に検出するための蛍光色素の組を得ることと関連した幾つかの難点がある。例えば、その組中の夫々の色素はその他の色素からスペク

トル的に分解可能である必要がある。発光スペクトルがスペクトル的に分解される色素の収集を見出すことは困難である。何となれば、有機蛍光色素に典型的な発光バンド半幅は約40-80 ナノメートル(nm)であり、利用可能なスペクトルの幅が励起光源により制限されるからである。色素の組に関して本明細書に使用される“スペクトルの分解”という用語は、色素の蛍光発光バンドが十分に異なり、即ち、十分に重ならないこと、夫々色素が結合される試薬、例えば、ポリヌクレオチドが通常の光検出系を使用して、例えば、米国特許第4,230,558号、同第4,811,218号、またはWheellessら、pgs.21-76, Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis (Academic Press, New York, 1985)により記載された系に例示されるような、バンドパスフィルター及び光電子増倍管の組、電荷カップリング装置及びスペクトログラフ等の系を使用して夫々の色素により生じた蛍光シグナルに基いて区別し得ることを意味する。

【0005】また、夫々の色素の蛍光シグナルは、夫々の成分が充分な感度で検出し得るように十分に強いものである必要がある。例えば、DNA配列決定の場合、増大されたサンプル装填は低い蛍光効率の保証とはなり得ない(Pringleら、DNA CoreFacilities Newsletter, 1 15-21 (1988))。色素により生じた蛍光シグナルは、色素がその吸光度最大で励起される時に一般に最大である。それ故、夫々の色素はほぼその吸光度最大で励起されることが好ましい。色素の組の使用と関連する更に別の難点は、色素が一般に同じ吸光度最大を有しないことである。同じ吸光度最大を有しない色素の組が使用される場合、夫々の色素をその吸光度最大で励起するのに多光源を用意することと関連する高コストと、夫々の色素がその吸光度最大で励起されないことから生じる低感度の間に取決めが生じられる。上記の難点に加えて、色素の電荷、分子サイズ、及び配座がフラグメントの電気泳動移動度に悪影響してはならない。また、蛍光色素はフラグメントを生じ、または操作するのに使用される化学、例えば、DNA合成溶媒及び試薬、緩衝液、ポリメラーゼ酵素、リガーゼ酵素等と適合性である必要がある。特に4色DNA配列決定の領域において、多色用途のために色素の組を開発する際の多くの束縛のために、蛍光色素の少ない組のみが開発されていた。Connellら、Biotechniques 5 342-348 (1987)、Proberら、Science 238 336-341 (1987)、及びSmithら、Nature 321 674-679 (1986)。

【0006】多色用途に有益であることがわかった蛍光色素の一つのクラスはローダミン色素、例えば、テトラメチルローダミン(TAMRA)、ローダミンX(ROX)、ローダミン6G(R6G)、ローダミン110(R110)等である。米国特許第5,366,860号。ローダミン色素は蛍光色素に関して特に魅力的である。何となれば、(1)ローダミンは典型的にはフルオレセインより光安定性であり、(2)ロー

ダミン標識ジデオキシヌクレオチドが熱安定性ポリメラーゼ酵素に良好な基質であり、かつ(3) ローダミン色素の発光スペクトルがフルオレセインの赤色(高い波長)に対し顕著であるからである。特に多重検出方法の状況において、現在入手し得るローダミン色素に関連する一つの欠点はローダミン色素の比較的広い発光スペクトルである。この広い発光スペクトルはスペクトル上近い色素間のスペクトル分解を制限し、このような色素組み合わせの多成分分析を困難にする。現在入手し得るローダミン色素に関連する第二の欠点は、それらの吸収スペクトルが現在入手し得るソリッドステート周波数二倍グリーンダイオードレーザー、例えば、約532nmで発光ラインを有するネオジウムソリッドステートYAGレーザーの波長に適合しないことである。このようなレーザーを使用することは、それらのコンパクトなサイズ、長い有効寿命、及び出力の効率の良い使用のために非常に有利である。

【0007】エネルギー転移蛍光色素は、それらをサンプル中の多種標的物質の同時検出、例えば、DNA配列決定における使用に魅力的にする幾つの特徴を有する。例えば、単色ドナー蛍光体は、夫々の色素が共通の波長で強い吸収を有するようにエネルギー転移蛍光色素の組中で使用し得る。その時、アクセプター蛍光体をエネルギー転移色素中で変化することにより、スペクトル的に分解可能な蛍光発光を有する一連のエネルギー転移色素が発生し得る。また、エネルギー転移蛍光色素は非エネルギー転移蛍光色素よりも大きい有効なストークシフトを与える。これは、エネルギー転移蛍光色素に関するストークシフトがドナー蛍光体が光を最大に吸収する波長とアクセプター蛍光体が光を最大に放出する波長の差に基いているからである。一般に、大きなストークシフトを有する蛍光色素に対する要望が存する。蛍光色素を使用するアッセイの感度は、蛍光色素により生じた蛍光シグナルの強さに依存する。それ故、強い蛍光シグナルを有する蛍光色素に対する要望が存する。エネルギー転移蛍光色素に関して、これらの色素の蛍光シグナル強さは、如何に有効にアクセプター蛍光体がドナー蛍光体のエネルギー放出を吸収するかに依存する。これは、順に、アクセプター蛍光体へのドナー蛍光体の近接及びアクセプター蛍光体に対するドナー蛍光体の配向を含む種々の変数に依存する。それ故、ドナー蛍光体とアクセプター蛍光体の配向が、エネルギーがドナー蛍光体とアクセプター蛍光体の間で有効に転移されるようなものであるようなエネルギー転移蛍光色素に対する要望が存する。

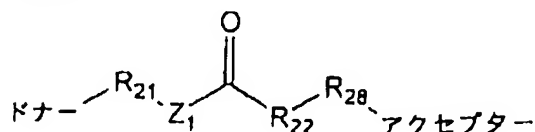
【0008】

【課題を解決するための手段】本発明はドナー色素をエネルギー転移蛍光色素中でアクセプター色素に結合するためのリンカーに関する。また、本発明は増強された蛍光を有するエネルギー転移蛍光色素に関する。また、本

発明は本発明のエネルギー転移色素を含む試薬、色素及び試薬の使用法、並びに色素及び試薬が含まれるキットに関する。ドナー色素をエネルギー転移蛍光色素中でアクセプター色素に結合するための本発明の一つのリンカーは、以下に説明されるような一般構造式 $R_{21}Z_1C(0)R_{22}R_{28}$ (式中、 R_{21} はドナー色素に結合された C_{1-5} アルキルであり、 $C(0)$ はカルボニル基であり、 Z_1 はNH、硫黄または酸素であり、 R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環または6員環または縮合環構造であってもよいカルボニル炭素に結合された置換基であり、かつ R_{28} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む)を有する。

【0009】

【化23】



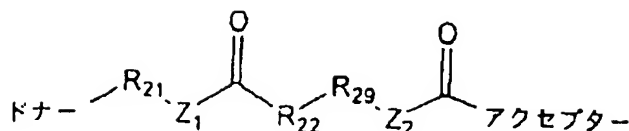
【0010】リンカー中に使用される R_{28} 基は、 R_{22} 基をアクセプター色素に結合するのに使用し得る当業界で知られているあらゆる基であってもよい。典型的には、 R_{28} 基はアクセプター色素のベンゼン環またはその他の芳香族環構造に結合されるであろう。それ故、 R_{28} はアクセプター色素のベンゼン環またはその他の芳香族環構造に親電子官能基、例えば、カルボン酸、酸ハライド、スルホン酸、エステル、アルデヒド、チオ、ジスルフィド、イソチオシアネート、イソシアネート、スルホニルハライド、マレイミド、ヒドロキシルスクシンイミドエステル、ハロアセチル、ヒドロキシルホルスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、及びアジドを形成することにより形成されることが好ましい。その時、 R_{22} 基は、アクセプター色素の親電子剤を求核体、例えば、アミノ、ヒドロキシルまたはスルフヒドリル求核体と反応させることにより、 R_{22} 基へのドナー色素の結合の前または後にアクセプター色素に付加し得る。

【0011】

【発明の実施の形態】例えば、以下に説明される実施態様において、リンカーは一般構造式 $R_{21}Z_1C(0)R_{22}R_{29}Z_2C(0)$ (式中、 R_{21} 及び R_{22} は上記のとおりであり、 Z_1 及び Z_2 は夫々独立にNH、硫黄または酸素であり、 R_{29} は C_{1-5} アルキルであり、末端カルボニル基はアクセプター色素の環構造に結合されている)を有する。 Z_2 が窒素である変化において、 $C(0)R_{22}R_{23}Z_2$ サブユニットはアミノ酸サブユニットを形成する。

【0012】

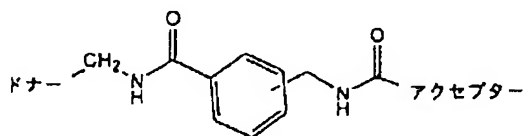
【化24】



【0013】この実施態様において、リンカーは活性化カルボニル基(NHSエステル)とアミン基、ヒドロキシル基またはチオール基の反応により生成されてもよい。R₂₂基をアクセプター色素に結合するための多種のその他のメカニズムが考えられ、本発明の範囲内に入ることが意図されていることが注目される。リンカー中でR₂₂として使用し得る5員環または6員環の特別な例として、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ビリジン、ピリダジン、ピリミジン、プラジン及びオキサジンが挙げられるが、これらに限定されない。縮合環構造の例として、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール及びナフタレンが挙げられるが、これらに限定されない。このリンカーの好ましい実施態様は、以下に示されるように、R₂₁及びR₂₉がメチレンであり、Z₁及びZ₂がNHであり、かつR₂₂がベンゼンである場合である。

【0014】

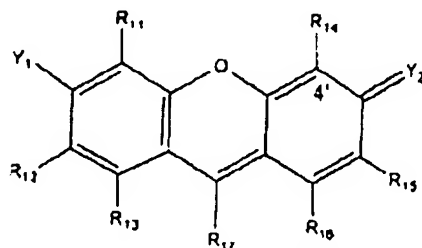
【化25】



【0015】本発明のエネルギー転移蛍光色素の一つのクラスは4'環位置に下記のキサンテン環構造を有するドナー色素を含む。

【0016】

【化26】

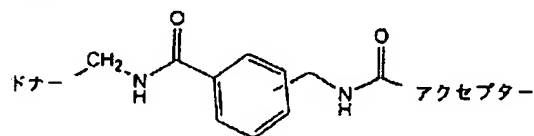


【0017】式中、Y₁及びY₂は別々にされてヒドロキシル、酸素、イミニウムまたはアミンであり、イミニウム及びアミンは三級のイミニウムまたはアミンであることが好ましい。R₁₁〜R₁₇は本発明のエネルギー転移色素と適合性であるあらゆる置換基であってもよく、R₁₁〜R₁₇は色素のスペクトル特性及び移動度特性を変化するために広く変化されてもよいことが注目される。こ

の実施態様によれば、エネルギー転移色素はまたドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発するアクセプター色素を含む。また、エネルギー転移色素はドナー色素をアクセプター色素に結合するリンカーを含む。エネルギー転移色素のこの実施態様の一つの変化において、リンカーは上記のように一般構造式R₂₁Z₁C(O)R₂₂R₂₈(式中、R₂₁はキサンテンドナー色素の4'位に結合されたC₁₋₅アルキルであり、C(O)はカルボニル基であり、Z₁はNH、硫黄または酸素であり、R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環もしくは6員環または縮合環構造であってもよいカルボニル炭素に結合された置換基であり、かつR₂₈はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む)を有する。エネルギー転移色素のこの実施態様の更に別の変化において、リンカーは上記のように一般構造式R₂₁Z₁C(O)R₂₂R₂₉Z₂C(O)(式中、R₂₁及びR₂₂は上記のとおりであり、Z₁及びZ₂は夫々独立にNH、硫黄または酸素であり、R₂₉はC₁₋₅アルキルであり、末端カルボニル基はアクセプター色素の環構造に結合されている)を有する。Z₂が窒素である変化において、-C(O)R₂₂R₂₉Z₂-はアミノ酸サブユニットを形成する。エネルギー転移色素のこの実施態様の更に別の好ましい変化において、リンカーは以下に示されるように、R₂₁及びR₂₉がメチレンであり、Z₁及びZ₂がNHであり、かつR₂₂がベンゼンである場合である。

【0018】

【化27】

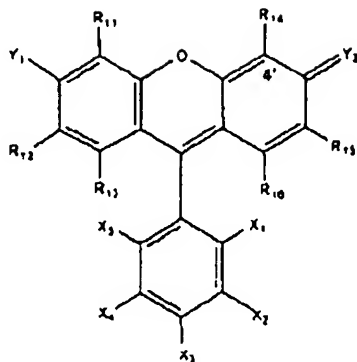


【0019】ドナー色素は必要によりR₁₇がフェニルまたは置換フェニルである色素のクラスの一員であってもよい。Y₁がヒドロキシルであり、かつY₂が酸素であり、かつR₁₇がフェニルまたは置換フェニルである場合、その色素は色素のフルオレセインクラスの一員である。Y₁がアミンであり、かつY₂がイミニウムであり、かつR₁₇がフェニルまたは置換フェニルである場合、その色素は色素のローダミンクラスの一員である。更にこの実施態様によれば、アクセプター色素は必要により色素のキサンテンクラス、シアニンクラス、フタロシアニンクラス及びスクアラインクラスの一員であってもよい。別の実施態様において、エネルギー転移蛍光色

案は一般構造式

【0020】

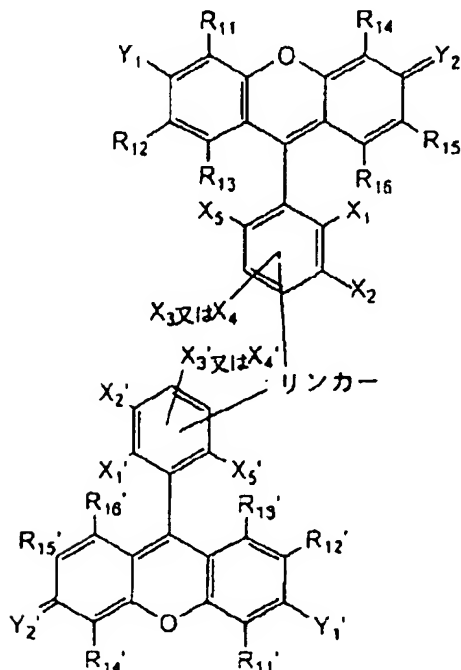
【化28】



【0021】を有するドナー色素及びアクセプター色素を有する。式中、 Y_1 及び Y_2 は別々にされてヒドロキシル、酸素、イミニウムまたはアミンであり、イミニウム及びアミンは三級のイミニウムまたはアミンであることが好ましく、かつ $R_{11} - R_{17}$ は本発明のエネルギー転移色素と適合性であるあらゆる置換基である。この実施態様によれば、以下に説明されるように、リンカーがドナー色素及びアクセプター色素の夫々の X_3 置換基及び X_4 置換基の一つ、好ましくはドナー色素及びアクセプター色素の X_3 置換基に結合される。この実施態様において、リンカーは短く、かつ／または硬質であることが好ましい。何となれば、これがドナー色素とアクセプター色素の間のエネルギーの転移を増進することがわかったからである。

【0022】

【化29】



【0023】別の実施態様において、エネルギー転移

光色素は色素のキサンテンクラスの一員であるドナー色素、ドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができる色素のキサンテンクラス、シアニンクラス、フタロシアニンクラス及びスクアラインクラスの一員であるアクセプター色素、及びドナー色素をアクセプター色素に結合するリンカーを含む。この実施態様によれば、アクセプターは約600nm より大きく、またはドナー色素の吸光度最大よりも少なくとも約100nm 大きい発光最大を有する。上記の新規なエネルギー転移蛍光色素に加えて、本発明はまたエネルギー転移蛍光色素を含む蛍光試薬に関する。一般に、これらの試薬は、本発明のエネルギー転移色素が結合でき、エネルギー転移色素の蛍光に基いて試薬の存在を検出するのに使用し得るあらゆる分子または物質を含む。一実施態様において、エネルギー転移蛍光色素で標識された、ヌクレオシドまたはモノー、ジーもしくはトリホスフェートヌクレオチドを含む蛍光試薬が提供される。ヌクレオチドは、例えば、色素標識オリゴヌクレオチドの調製に使用し得るデオキシヌクレオチドであってもよい。また、ヌクレオチドは、例えば、色素ターミネーター配列決定に使用し得るジデオキシヌクレオシドであってもよい。別の実施態様において、蛍光試薬はエネルギー転移蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドを含む。これらの試薬は、例えば、色素プライマー配列決定に使用し得る。

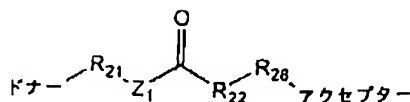
【0024】また、本発明は本発明のエネルギー転移色素及び試薬を使用する方法に関する。一実施態様において、その方法は本発明のエネルギー転移色素で標識された一連の異なるサイズのオリゴヌクレオチドを生成し、サイズに基いて一連の標識されたオリゴヌクレオチドを分離し、エネルギー転移色素の蛍光に基いて分離された標識されたオリゴヌクレオチドを検出することを含む。この方法の一実施態様において、延長された標識されたプライマーの混合物がデオキシヌクレオチドトリホスフェート、及び少なくとも一種の色素標識されたジデオキシヌクレオチドトリホスフェート及びDNAポリメラーゼの存在下で核酸配列をオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリッドを形成することにより生成される。DNAポリメラーゼは、プライマーの延長を終止するジデオキシヌクレオチドトリホスフェートがとり込まれるまでプライマーをデオキシヌクレオチドトリホスフェートで延長するのに利用できる。一旦終止されると、延長されたプライマーの混合物が分離され、ジデオキシヌクレオチドの色素の蛍光に基いて検出される。この実施態様の変化において、4種の異なる蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドトリホスフェート、即ち、蛍光標識されたジデオキシシトシントリホスフェート、蛍光標識されたジデオキシアデノシントリホスフェート、蛍光標識されたジデオキシグアノシントリホスフェート、及び蛍光標識されたジデオキシチミジントリホスフェートが使用さ

れる。この方法の別の実施態様において、オリゴヌクレオチドプライマーはデオキシヌクレオシドトリホスフェートとは反対に蛍光標識される。また、本発明は本発明の色素及び試薬を使用してDNA配列決定を行うための色素及び試薬を含むキットに関する。

【0025】I. 本発明のエネルギー転移色素リンカー
本発明はドナー色素をエネルギー転移蛍光色素中でアクセプター色素に結合するための新規なリンカーに関する。また、本発明はこれらのリンカーを含むエネルギー転移蛍光色素に関する。これらのリンカーはエネルギー転移色素中でドナー色素とアクセプター色素の間のエネルギーの有効な転移を増進することがわかった。ドナー色素をエネルギー転移蛍光色素中でアクセプター色素に結合するための本発明の一つのリンカーは以下に説明されるような一般構造式 $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{28}$ (式中、 R_{21} はドナー色素に結合された C_{1-5} アルキルであり、 $C(O)$ はカルボニル基であり、 Z_1 はNH、硫黄または酸素であり、 R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造を含む置換基であり、かつ R_{28} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む) を有する。

【0026】

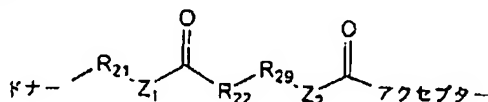
【化30】



【0027】このリンカーの一実施態様において、以下に説明されるように、リンカーは一般構造式 $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{29}Z_2C(O)R_{23}$ (式中、 R_{21} 及び R_{22} は上記のとおりであり、 Z_1 及び Z_2 は夫々独立にNH、硫黄または酸素であり、 R_{29} は C_{1-5} アルキルであり、末端カルボニル基はアクセプター色素の環構造に結合されている) を有する。 Z_2 が窒素である変化において、 $C(O)R_{22}R_{29}Z_2$ サブユニットはアミノ酸サブユニットを形成する。

【0028】

【化31】

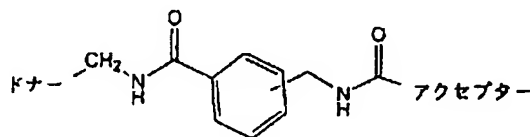


【0029】リンカー中で R_{22} として使用し得る5員環または6員環の特別な例として、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、プライン及びオキサジンが挙げられるが、これらに

限定されない。縮合環構造の例として、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール及びナフタレンが挙げられるが、これらに限定されない。このリンカーの好ましい実施態様は、以下に示されるように、 R_{21} 及び R_{29} がメチレンであり、 Z_1 及び Z_2 がNHであり、かつ R_{22} がベンゼンである場合である。

【0030】

【化32】



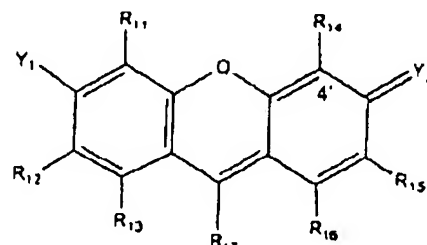
【0031】表3は本発明のリンカー中に使用し得るリンカーの $-C(O)R_{22}-$ サブユニットの例を示す。

II. 本発明のエネルギー転移色素

一般に、本発明のエネルギー転移色素は第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出するドナー色素、ドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができるアクセプター色素、及びドナー色素をアクセプター色素に結合するリンカーを含む。本明細書に示された分子構造の全てに関して、これらの分子構造は示された正確な電子構造を含むだけでなく、その全ての共鳴構造及びプロトン化状態を含むことが意図されている。本発明のエネルギー転移蛍光色素の一つのクラスは色素のキサンテンクラスの一員であるドナー色素、アクセプター色素及び節Iに記載されたリンカーのグループの一員であるリンカーを含む。本明細書に使用されるキサンテン色素は一般構造式

【0032】

【化33】

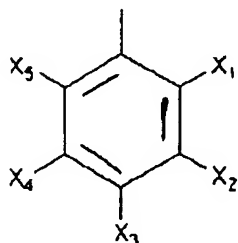


【0033】を有する全ての分子を含む。式中、 Y_1 及び Y_2 は別々にされてヒドロキシル、酸素、イミニウムまたはアミンであり、イミニウム及びアミンは三級のイミニウムまたはアミンであることが好ましい。 Y_1 がヒドロキシルであり、かつ Y_2 が酸素であり、かつ R_{17} がフェニルまたは置換フェニルである場合、その色素は色素のフルオレセインクラスの一員である。 Y_1 がアミンである、かつ Y_2 がイミニウムであり、かつ R_{17} がフェニルまたは置換フェニルである場合、その色素は色素のローダミンクラスの一員である。 $R_{11}-R_{17}$ は本発明のエネルギー転移色素と適合性であるあらゆる置換基であ

ってもよく、 R_{11} – R_{17} は色素のスペクトル特性及び移動度特性を変化するために広く変化されてもよいことが注目される。環構造中に示された番号はキサンテン環構造の4'位を示す。リンカーがキサンテン環構造の4'位に結合されている本発明のエネルギー転移色素について、 R_{14} サブユニットがリンカーに相当する。 R_{11} – R_{17} 置換基の例として、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。一実施態様において、 R_{15} 及び R_{16} は一緒にされて置換または未置換ベンゼン環を形成する。キサンテン色素のこのクラスは本明細書中非対称ベンゾキサンテン色素と称され、Scott C. Bensonらにより1996年4月1日出願された米国特許出願第08/626,085号（発明の名称：非対称ベンゾキサンテン色素）に記載されており、この特許が参考として本明細書に含まれる。別の実施態様において、 R_{17} は一般式

【0034】

【化34】



【0035】を有するフェニルまたは置換フェニルである。フェニル環の置換基 X_1 – X_5 として、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせが挙げられる。一実施態様において、ドナー色素は、本明細書中4,7-ジクロロローダミン色素と称される、 Y_1 がアミンであり、 Y_2 がイミニウムであり、かつ X_2 及び X_5 が塩素である色素のクラスの一員である。色素の4,7-ジクロロローダミンクラス内に入る色素及びそれらの合成が本明細書並びに1996年6月27日出願された米国特許出願第08/672,196号（発明の名称：4,7-ジクロロローダミン色素）に記載されており、この特許が参考として本明細書に含まれる。

【0036】ここで使用されるアルキルは直鎖及び分岐炭化水素部分、即ち、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、tert-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、ネオペンチル、tert-ペンチル等を表す。置換アルキルはヒドロキシ、アミノ、チオ、シアノ、ニトロ、スルホ、等を含むが、これらに限定されない種々の置換基のいづ

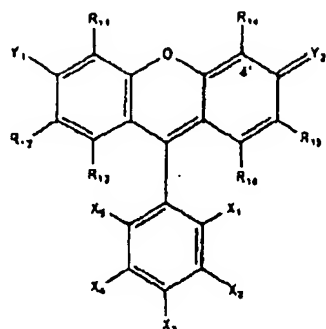
れか一つで置換されたアルキル部分を表す。ハロアルキルは一つ以上のハロゲン原子置換基、通常フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨードを有する置換アルキルを表す。アルケン炭素–炭素結合の一つ以上が二重結合であり、かつ非二重結合炭素がアルキルまたは置換アルキルである炭化水素を表す。アルキンは炭素の一つ以上が三重結合で結合されており、非三重結合炭素がアルキル部分または置換アルキル部分である炭化水素を表す。スルホネートは3個の酸素原子に結合された硫黄原子を含む部分（そのモノー及びジ塩を含む）、例えば、ナトリウムスルホネート、カリウムスルホネート、ジナトリウムスルホネート、等を表す。アミノは2個の水素原子、アルキル部分、またはこれらのあらゆる組み合わせに結合された窒素原子を含む部分を表す。アミドは酸素原子に二重結合され、アミノ部分に単結合された炭素原子を含む部分を表す。ニトリルは窒素原子に三重結合された炭素原子を含む部分を表す。アルコキシは酸素原子に単結合されたアルキル部分を含む部分を表す。アリールは単一または多数のフェニルまたは置換フェニル、例えば、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル等を表す。

【0037】 R_{11} – R_{17} はまた夫々独立にエネルギー転移色素を試薬、例えば、ヌクレオチド、ヌクレオシドまたはオリゴヌクレオチドに結合するのに使用し得る結合部分であってもよい。結合部分の例として、相補官能基が常にアミンである場合、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、4,6-ジクロロトリアジニルアミン、スクシンイミジルエステル、またはその他の活性カルボキシレートが挙げられる。相補官能基が常にスルフヒドリルである場合、結合基はマレイミド、ハロアセチル、またはヨードアセトアミドであることが好ましい。R. Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular probes, Inc. (1992)を参照のこと。特に好ましい実施態様において、図1に示されるように、結合基はアミノヘキシルオリゴマーと反応させられて色素標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを生成し得るドナー色素またはアクセプター色素のいずれかのカルボキシル基から生成された活性化NHSエステルである。この実施態様のエネルギー転移蛍光色素はまたドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができるアクセプター色素、及びドナー色素をアクセプター色素に結合するリンカーを含む。エネルギー転移色素の第一クラスにおいて、リンカーは節Iに記載されたリンカーのクラスの一員であり、キサンテン環構造の4'位でドナー色素に結合される。この第一クラスのエネギー転移色素はアクセプター蛍光体それ自体及び同じドナー–アクセプター対を有するエネルギー転移蛍光色素（この場合、ドナー–アクセプター対の間の結合が異なる）と比較して増強された蛍光強さを示す、ま

た、本発明は、ドナー色素及びアクセプター色素が夫々一般構造式

【0038】

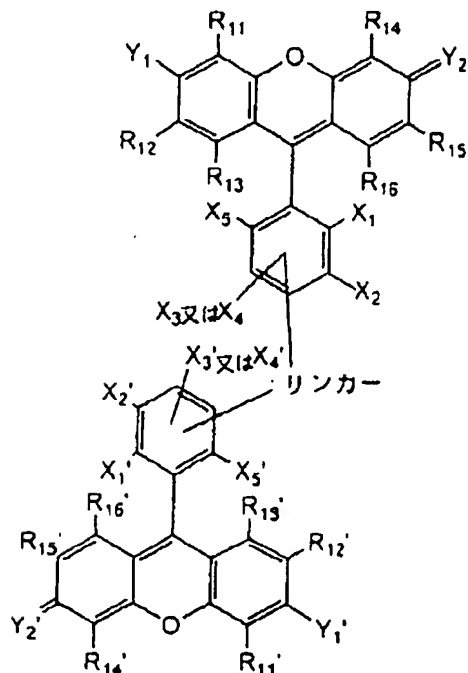
【化35】



【0039】(式中、 Y_1 、 Y_2 、 $R_{11} \sim R_{16}$ 及び $X_1 \sim X_6$ は先に特定されたとおりである)を有するエネルギー転移蛍光色素の第二クラスに関する。色素のこのクラスの中で、リンカーはドナー色素及びアクセプター色素の夫々の X_3 置換基及び X_4 置換基の一つによりドナー色素及びアクセプター色素に結合される。

【0040】

【化36】

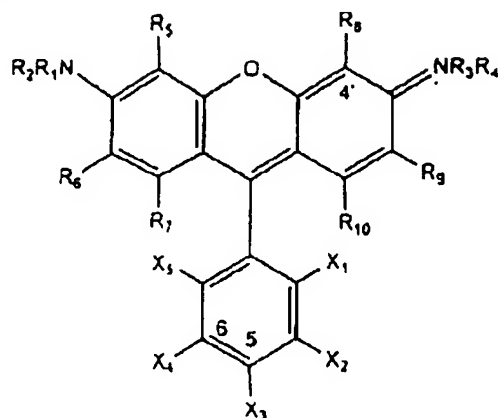


【0041】色素のこのクラスの好ましい実施態様において、リンカーはドナー色素及びアクセプター色素の夫々の X_3 置換基によりドナー色素及びアクセプター色素に結合される。色素のこのクラスの中で、リンカーは短く、かつ/または硬質であることが好ましい。何となれば、これがドナー色素とアクセプター色素の間のエネルギーの転移を増進することがわかったからである。また、本発明は、アクセプター色素が色素の4、7-ジクロロローダミンクラスの一員であるエネルギー転移蛍光

色素の第三クラスに関するものであり、即ち、その色素は一般構造式

【0042】

【化37】



【0043】を有する。式中、 $R_1 \sim R_4$ は夫々独立に水素、アルキル、または R_1 と R_5 、 R_2 と R_6 、 R_3 と R_8 、 R_4 と R_9 が一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせであり、 $R_5 \sim R_{10}$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、もしくは置換フェニル、または隣接置換基が一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせであり、 X_1 、 X_3 及び X_4 は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、もしくはアルコキシ、または隣接置換基が一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせであり、 X_2 及び X_5 は塩素である。 $R_1 \sim R_{10}$ 、 X_3 及び X_4 に関して、 R_1 と R_5 、 R_2 と R_6 、 R_3 と R_8 、 R_4 と R_9 、及び X_3 と X_4 は夫々独立に一緒にされて5員環、6員環、または7員環を形成してもよい。環構造中に示された番号(4'、5、6)はローダミン環構造の4'、5、6の環の位置を示す。本明細書に説明されるように、4'及び5の環の位置はドナー蛍光体をアクセプター蛍光体に結合する本発明のエネルギー転移色素中に使用されたリンカーの結合に好ましい部位である。4'、5、6の環の位置はまたエネルギー転移色素への生物分子、例えば、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの結合に好ましい部位である。

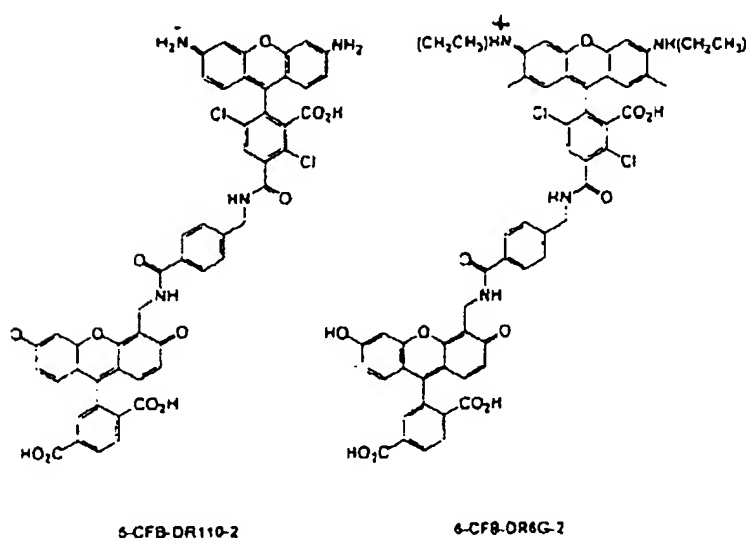
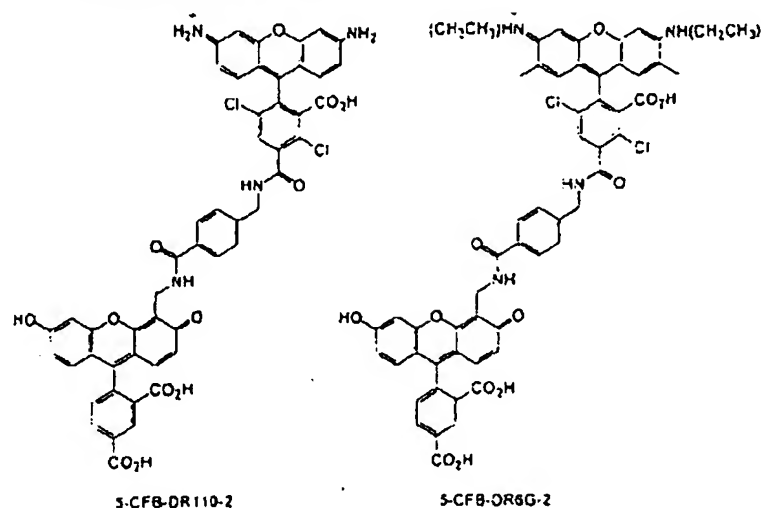
【0044】エネルギー転移色素のこのクラス中のドナー色素は励起エネルギーを放出するあらゆる色素を含んでいてもよく、その4、7-ジクロロローダミン色素がエネルギーを吸収し、応答してエネルギー放出を生じることができる。一実施態様において、ドナー色素は、4、7-ジクロロローダミンアクセプター色素がキサンテン色素の4'環位に結合されているリンカーによりド

ナー色素に結合される4'環位でキサントゲン環構造を有する。リンカーは4,7-ジクロロローダミンアクセプター色素の5環位または6環位に結合されることが好ましい。色素のこの第三クラス(即ち、4,7-ジクロロローダミンがアクセプター色素である場合)のエネルギー転移色素はその他のローダミン色素に較べて比較的狭い放出スペクトルを有するという利点を与える。この狭い放出スペクトルはこれらの色素の組により得られるスペクトル分解を増進し、それによりこれらの色素を使用する多成分分析を促進する。また、本発明はエネルギー転移蛍光色素の第四クラスに関するものであり、この場合、ドナー色素が色素のキサントゲンクラスの一員であり、アクセプター色素が色素のキサントゲンクラス、シアニンクラス、フタロシアニンクラス及びスクアライン

ラスの一員であり、アクセプターが約600nmより大きい放出最大を有し、かつ/または好ましくはドナー色素の吸光度最大よりも少なくとも約100nm大きい放出最大を有する。色素のこのクラスの中で、ドナーは色素のフルオレセインクラスの一員であることが好ましい。本発明のエネルギー転移色素の第四クラスは、ドナーの吸収とアクセプターの放出の差により測定して、大きいストークシフトを通常示す。加えて、これらの色素は、最小のドナー蛍光が観察される点で有効なエネルギー転移を示す。本発明のエネルギー転移色素の第四クラスが本明細書に更に詳しく記載される。

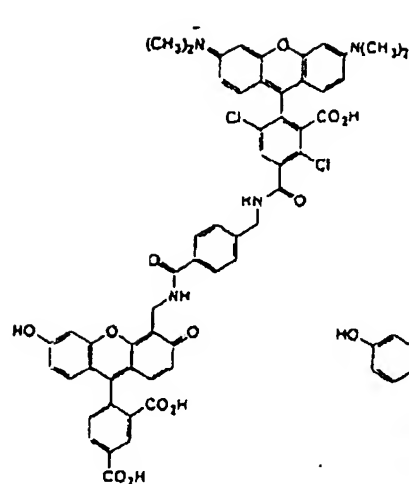
【0045】

【化38】

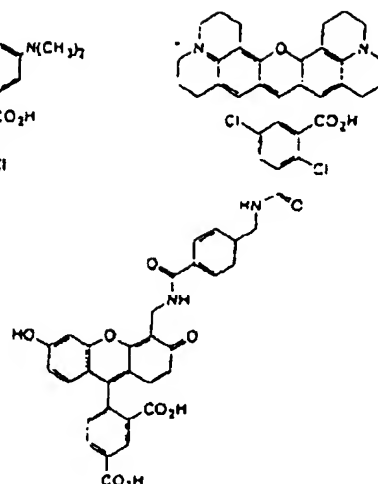


【0046】

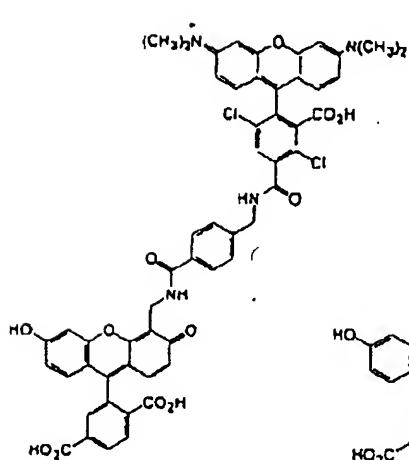
【化39】



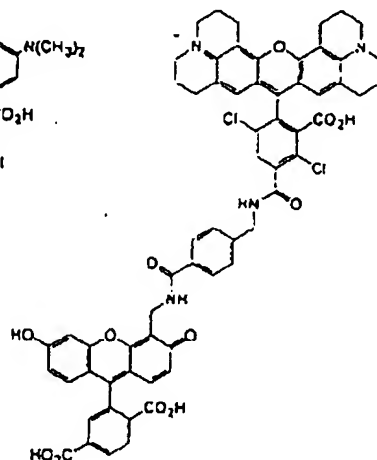
5-CFB-DTMR-2



5-CFB-DROX-2



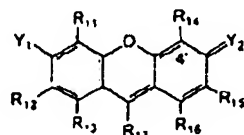
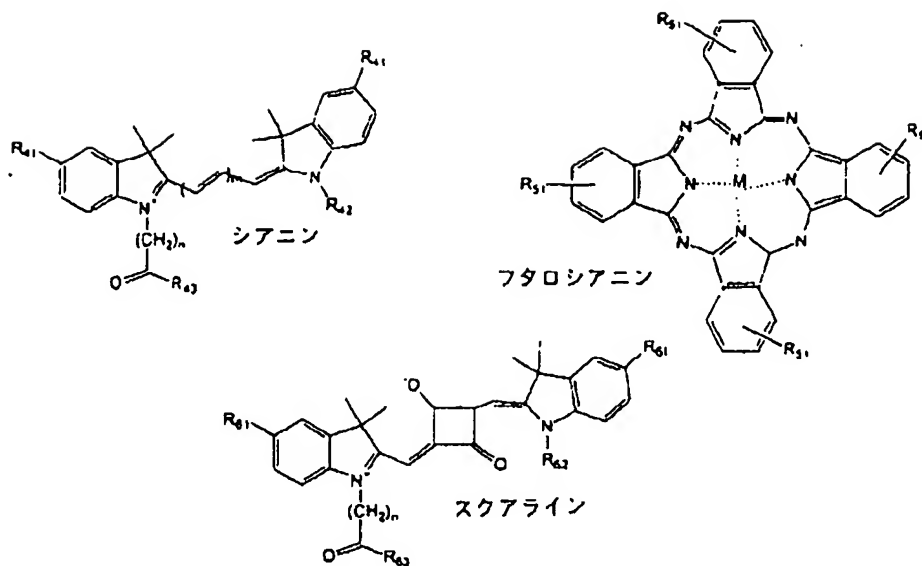
6-CFB-DTMR-2



6-CFB-DROX-2

【0047】

【化40】



キサントン

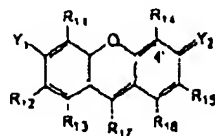
【0048】A. エネルギー転移色素の第一クラス

上記のように、本発明のエネルギー転移色素の第一クラスは色素のキサントンクラスの一員であり、それ故4'環位でキサントン環構造を有するドナー色素を含む。色素のこのクラス中で、アクセプター色素はドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長で蛍光を発することができる色素である。この実施態様によれば、ドナーは色素のフルオレセインクラス、ローダミンクラスまたは非対称ベンゾキサントンクラスの一員であってもよく、これらの色素の夫々は色素の更

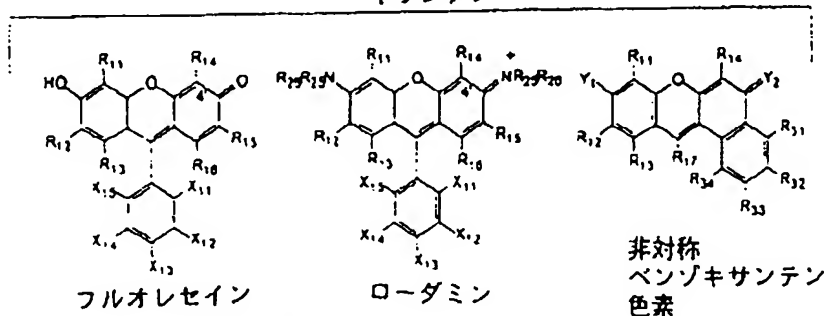
に広いキサントンクラスの一員である。これらのキサントン色素の一般構造式が以下に示される。これらの色素に関して説明された置換基は色素のこれらの異なるクラスに含まれてもよい多種の置換基から選ばれてもよい。何となれば、一般のキサントン環構造、フルオレセイン環構造、ローダミン環構造、及び非対称ベンゾキサントン構造を有する全ての色素が本発明の範囲内に入ることが意図されているからである。

【0049】

【化41】



キサントン



【0050】この実施態様のエネルギー転移蛍光色素中に使用し得るアクセプター色素のクラスの例として、キサントン色素、シアニン色素、フタロシアニン色素及び

スクアライン色素が挙げられるが、これらに限定されない、これらの色素の一般構造式が表1Aに示される。これらの色素について説明された置換基は色素のこれらの

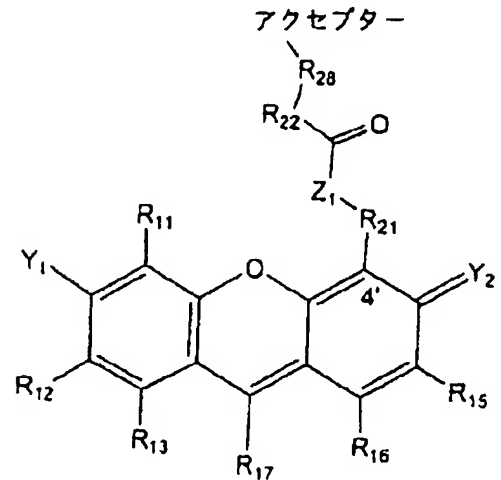
異なるクラスに含まれてもよい多種の置換基から選ばれてもよい。何となれば、一般のキサントン環構造、フルオレセイン環構造、ローダミン環構造、非対称ベンゾキサントン環構造、シアニン環構造、フタロシアニン環構造及びスクアライン環構造を有する全ての色素が本発明の範囲内に入ることが意図されているからである。この実施態様に使用し得るドナー色素の例として、フルオレセイン、カルボキシフルオレセインの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、カルボキシ-HEXの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、NAN、CI-FLAN、TET、JOE、ZOE、ローダミン、カルボキシローダミンの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、カルボキシR110の異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、カルボキシR6Gの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、4,7-ジクロロフルオレセイン（米国特許第5,188,934号を参照のこと）、4,7-ジクロロローダミン（1996年6月27日に提出された米国特許出願第08/672,196号を参照のこと）、非対称ベンゾキサントン色素（1996年4月1日に提出された米国特許出願第08/626,085号を参照のこと）、及びN, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン（TMARA）の異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】この実施例に使用し得るアクセプター色素の例として、カルボキシフルオレセインの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、4,7-ジクロロフルオレセイン、4,7-ジクロロローダミン、フルオレセイン、非対称ベンゾキサントン色素、カルボキシ-HEXの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、NAN、CI-FLAN、TET、JOE、ZOE、ローダミン、カルボキシローダミンの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、カルボキシR110の異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、カルボキシR6Gの異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン（TMARA）の異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）、カルボキシ-X-ローダミン（ROX）の異性体（例えば、5カルボキシ及び6カルボキシ）及びCy5が挙げられるが、これらに限定されない。これらの色素の構造式が表2に示される。本発明のエネルギー転移色素の第一クラスにおいて、リンカーはキサントン環構造の4'位でドナー色素に結合される。一実施態様において、リンカーは以下に示されるような一般構造式 $R_{21}Z_1C(=O)R_{22}R_{29}$ （式中、 R_{21} はドナーキサントン色素の4'環位に結合されている C_{1-5} アルキルであり、 Z_1 はNH、硫黄または酸素であり、 $C(=O)$ はカルボニル基であり、 R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造

を含む置換基であり、かつ R_{28} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基である）を有する。

【0052】

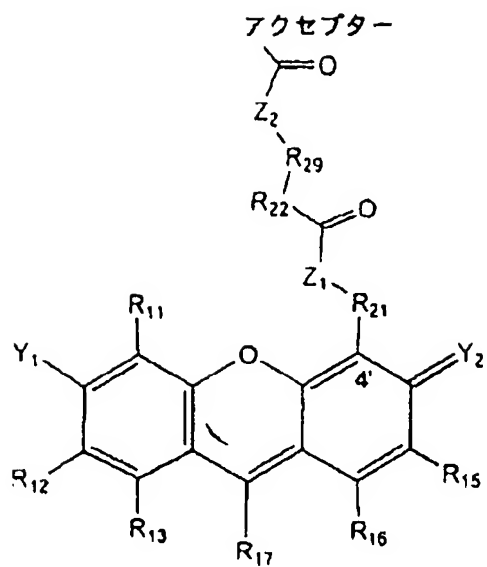
【化42】



【0053】 R_{22} 中に使用し得る5員環または6員環の例として、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ビリジン、ピリダジン、ピリミジン、アラジン及びオキサジンが挙げられるが、これらに限定されない。縮合環構造の例として、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール及びナフタレンが挙げられるが、これらに限定されない。この実施態様の一つの変化において、以下に示されるように、リンカーは一般構造式 $R_{21}Z_1C(=O)R_{22}R_{29}Z_2C(=O)$ （式中、 R_{21} はドナーキサントン色素の4'環位に結合されている C_{1-5} アルキルであり、 Z_1 及び Z_2 は夫々独立にNH、硫黄または酸素であり、 $C(=O)$ はカルボニル基であり、 R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造を含む置換基であり、 R_{29} は C_{1-5} アルキルであり、末端カルボニル基はアクセプター色素の環構造に結合されている）を有する。

【0054】

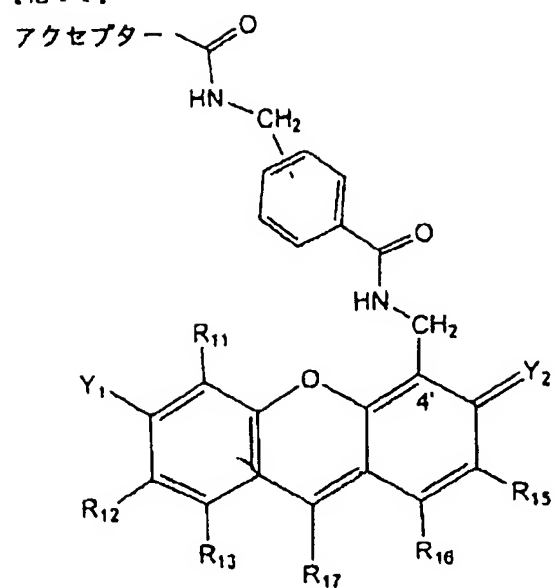
【化43】



【0055】このリンカーの好ましい実施態様は、以下に示されるように、 R_{21} 及び R_{29} がメチレンであり、 Z_1 及び Z_2 がNHであり、かつ R_{22} がベンゼンである場合である。

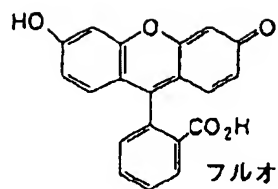
【0056】

【化44】

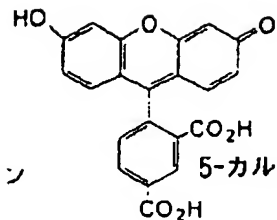


【0057】

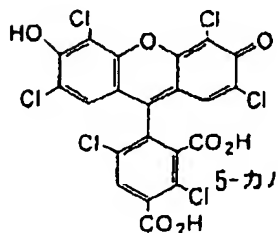
【化45】



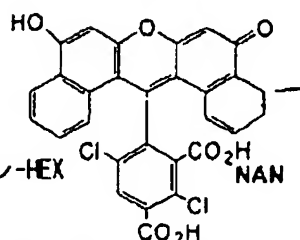
フルオレセイン



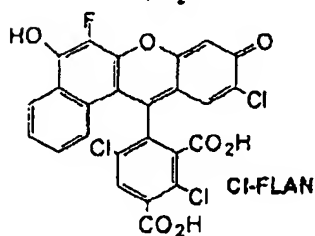
5-カルボキシフルオレセイン



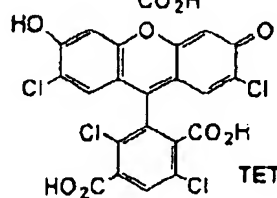
5-カルボキシ-HEX



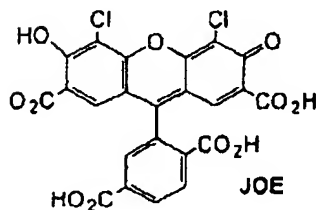
NAN



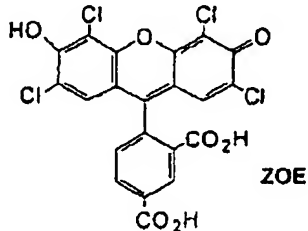
Cl-FLAN



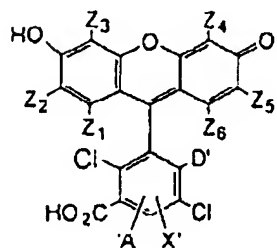
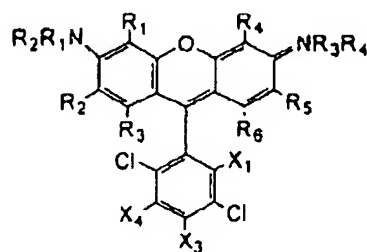
TET



JOE



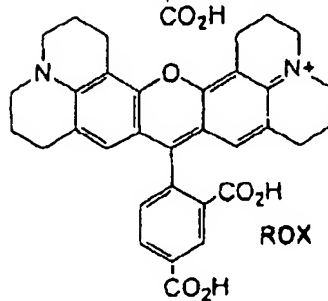
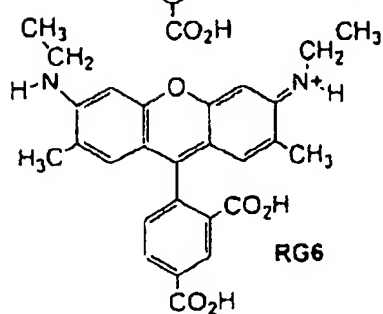
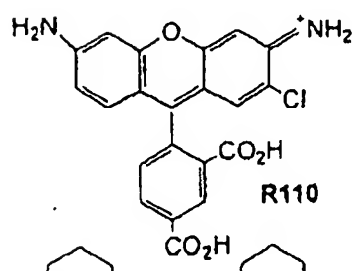
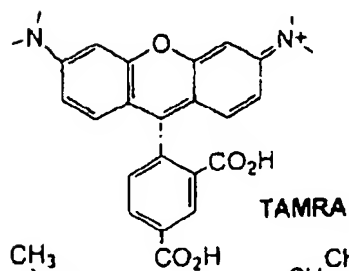
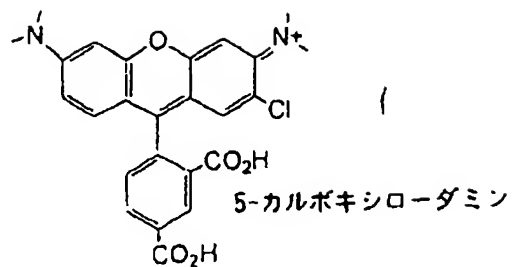
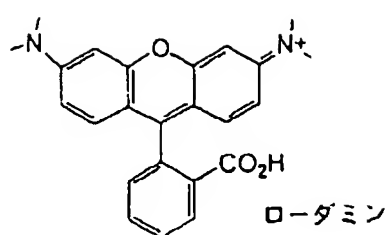
ZOE

4,7 ジクロロフルオレセイン
(米国特許第5,188,934 号を参照
のこと)

4,7ジクロロローダミン

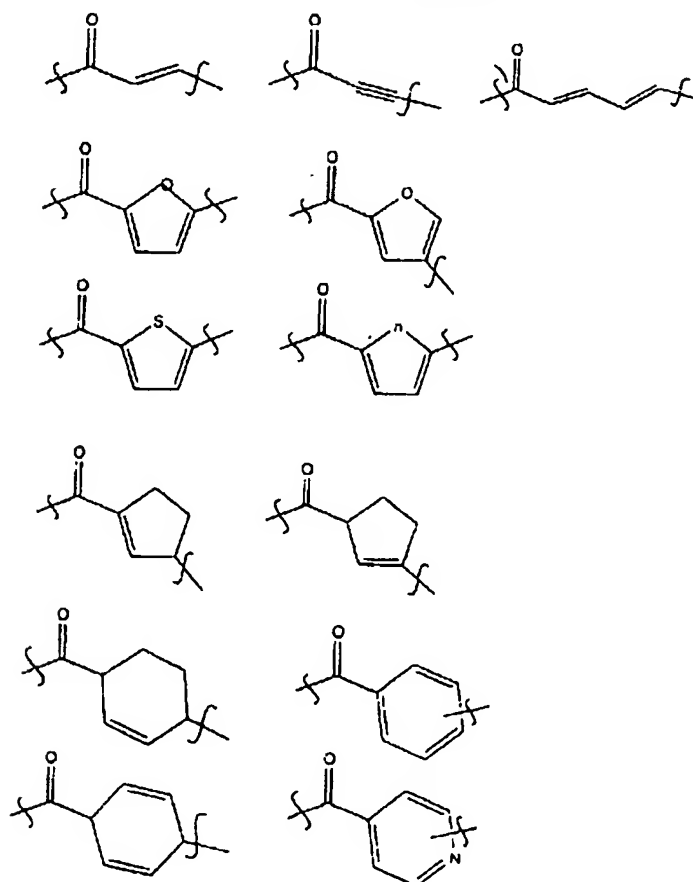
【0058】

【化46】



【0059】

【化47】



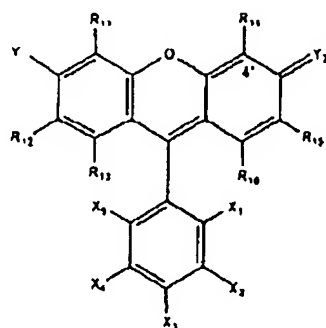
【0060】実施例4及び図2に示されるように、先に

特定されたようなドナー、アクセプター及びリンカーを

含む、5-TMR-B-CFの如きエネルギー転移色素は、アクセプターそれ自体並びにドナー-アクセプター対の間のリンカーが異なる場合の同じドナー-アクセプター対を有するエネルギー転移蛍光色素に較べて増強された蛍光を示す。理論により縛られないで、観察された増強された蛍光強さはリンカーの比較的硬質な R_{22} 部分により得られ、維持されるドナー色素とアクセプター色素の間の改良されたエネルギー転移配向のためであると考えられる。その結果として、本発明のエネルギー転移蛍光色素はアクセプター蛍光体それ自体並びにドナー-アクセプター対の間のリンカーが異なる場合の同じドナー-アクセプター対を有するエネルギー転移蛍光色素に較べて増強された蛍光強さを示す。これらの色素の増強された蛍光強さは色素スタッキングを低下するのに利用できる8M尿素の存在下で特に明らかである。この実施態様の一つの変化において、アクセプターは一般構造式

【0061】

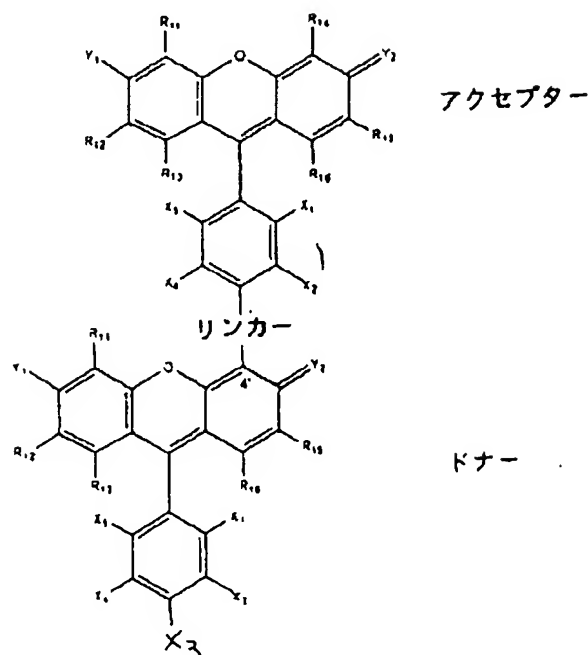
【化48】



【0062】(式中、 Y_1 、 Y_2 、 $R_{11} \sim R_{19}$ 及び $X_1 \sim X_9$ は先に特定されたとおりである)を有する色素のキサンテンクラスの一員である。この変化によれば、上記リンカーの如きリンカーはアクセプターキサンテン色素の X_3 または X_4 置換基を介してアクセプターキサンテン色素に結合されることが好ましい。以下に示されるような好ましい実施態様において、リンカーはアクセプターキサンテン色素の X_3 置換基に結合される。

【0063】

【化49】



【0064】表4は本発明のこの実施態様の上記エネルギー転移色素の例を示す。表4中に示された色素は5-

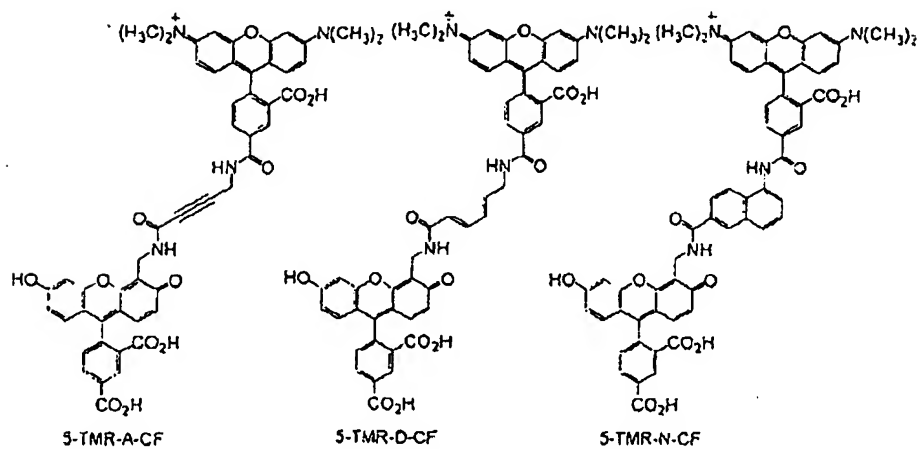
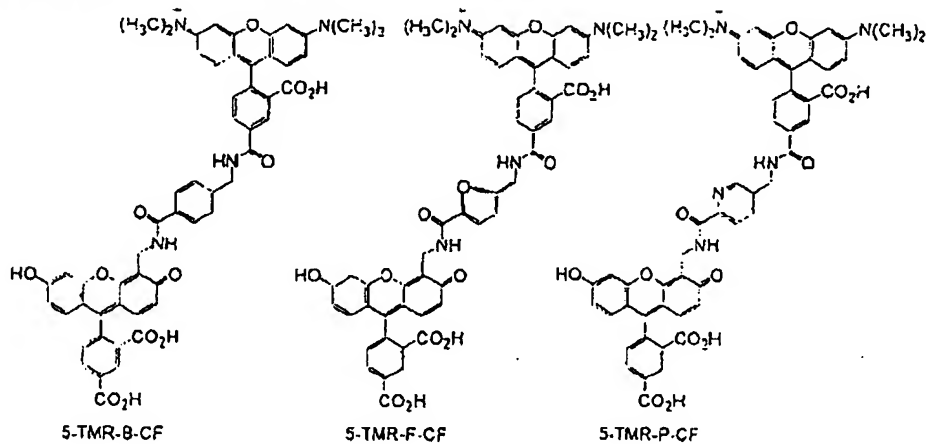
カルボキシフルオレセインドナー色素及びTAMRA アクセプター色素を含むが、多種のその他のキサンテン色素が

ドナー色素として容易に置換し得ることが理解されるべきであることが注目される。また、多種のその他のキサンテン色素、並びにシアニン色素、フタロシアニン色素及びアクアライン色素が上記されたTAMRA アクセプター色素に代えて容易に置換し得ることが理解されるべきで

あり、ドナー色素及びアクセプター色素に関するこれらの変化の全てが本発明の範囲内に入る。

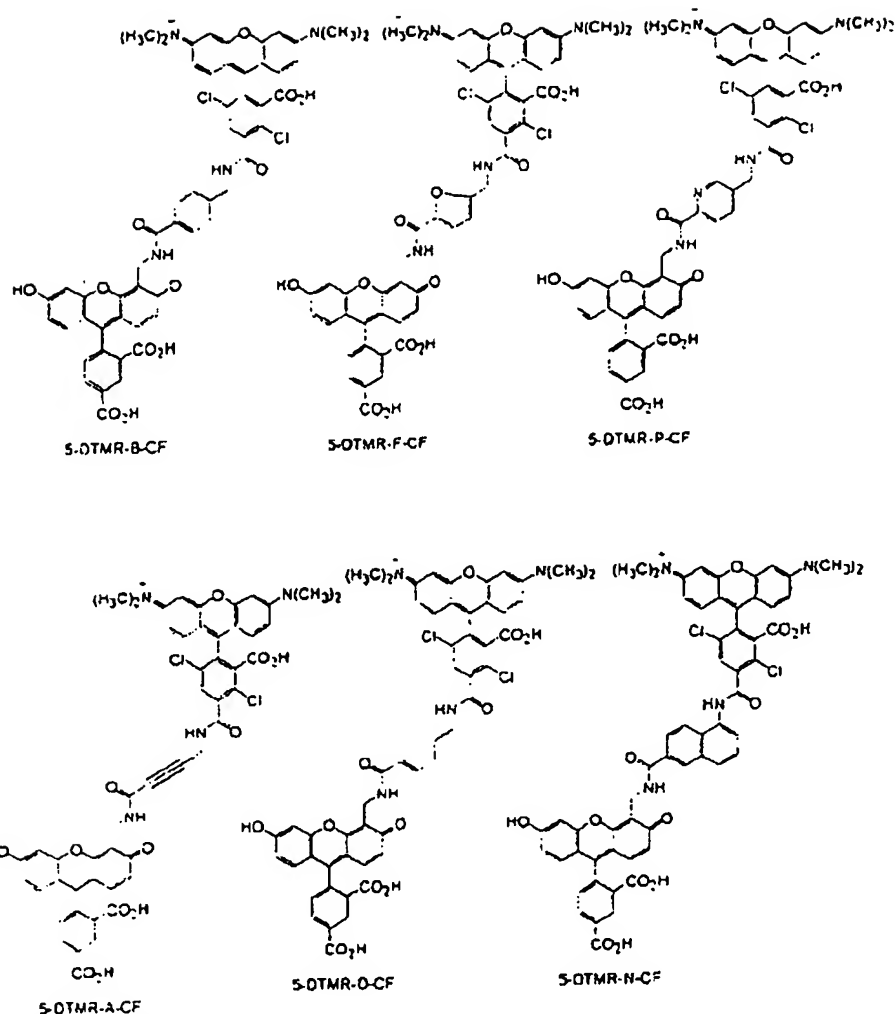
【0065】

【化50】



【0066】

【化51】

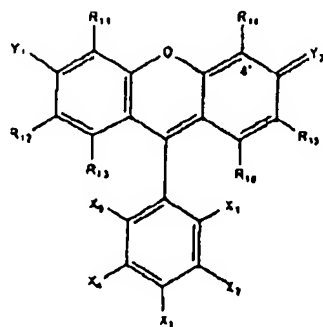


【0067】B. エネルギー転移色素の第二クラス

本発明はまたドナー色素及びアクセプター色素が一般構造式

【0068】

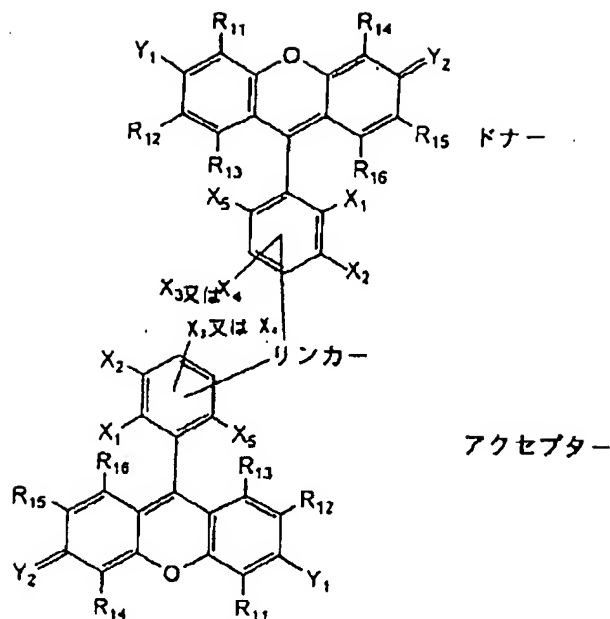
【化52】



【0069】(式中、 Y_1 、 Y_2 、 $R_{11} \sim R_{15}$ 及び $X_1 \sim X_5$ は先に特定されたとおりである)を有する色素のキサンテンクラスの員である、以下に示されるようなエネルギー転移蛍光色素の第二クラスに関する。この実施態様によれば、リンカーは以下に示されるようにドナー色素及びアクセプター色素の両方の X_3 または X_4 置換基に結合される。

【0070】

【化53】



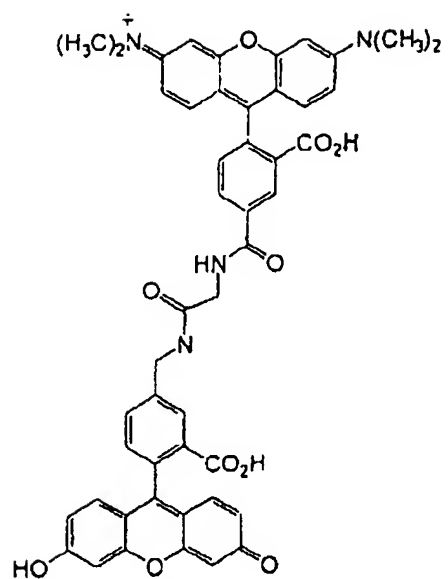
【0071】この実施態様において、リンカーは短く、かつ／または硬質であることが好ましい。何となれば、これがドナー色素とアクセプター色素の間のエネルギーの転移を増進することがわかったからである。例えば、この実施態様の一つの変化において、リンカーは長さが9原子未満であるドナーをアクセプターに結合する主鎖を有することが好ましい。この実施態様の別の変化において、リンカーはリンカーに或る程度の構造上の剛性を与える官能基、例えば、アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環または縮合環構造を含む。更に別の変化において、リンカーは一般式 $R_{25}Z_3C(O)$ または $R_{25}Z_3C(O)R_{25}Z_4C(O)$ (式中、 R_{25} はドナー色素に結合されており、 $C(O)$ はカルボニル基であり、末端カルボニル基はアクセプター色素に結合されており、 R_{25} 及び R_{25} は夫々 C_{1-4} アルキルの群から選ばれ、かつ Z_3 及び Z_4 は夫々独立にN、H、OまたはSである)を有する。この実施態様に使用し得るドナー色素及びアクセプター色素の例として、フルオレセイン、5または6カルボキシフルオレセイン、5または6カルボキシ-HEX、NAN、Cl-FLAN、TET、JOE、ZOE、4、7-ジクロロフルオレセイン、非対称ベンゾキサンテン色素、ローダミン、5または6カルボキシローダミン、5または6カルボキ

シー-R110、5または6カルボキシ-R6G、N、N、N'、N'-テトラメチル(5または6)-カルボキシローダミン(TAMRA)、5または6カルボキシ-X-ローダミン(ROX)及び4、7-ジクロロローダミンが挙げられるが、これらに限定されない。これらの色素の構造式が表2に示される。

【0072】この実施態様の別の変化において、リンカーは $R_{27}Z_5C(O)$ 基(式中、 R_{27} はドナー色素に結合された C_{1-5} アルキルであり、 Z_5 はNH、硫黄または酸素であり、かつ $C(O)$ はアクセプター色素に結合されたカルボニル基である)を含む。表5は本発明のエネルギー転移色素の第二クラスの例を示す。表5に示された色素は5-アミノメチルフルオレセインドナー色素を含むが、多種のその他のキサンテン色素がドナー色素として容易に置換し得ることが理解されるべきであることが注目される。また、多種のその他のキサンテン色素、並びにシアニン色素、フタロシアニン色素及びアクアライン色素が上記されたTAMRAアクセプター色素に代えて容易に置換し得ることが理解されるべきであり、ドナー色素及びアクセプター色素に関するこれらの変化の全てが本発明の範囲内に入る。

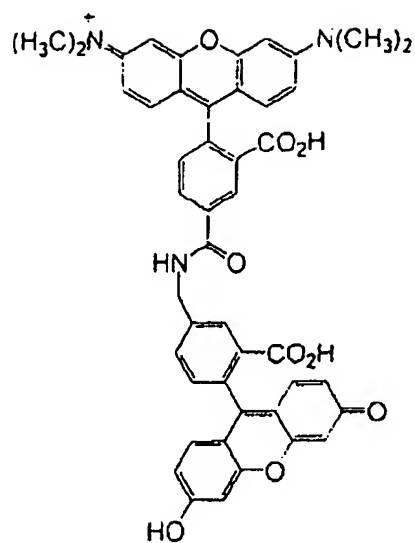
【0073】

【化54】



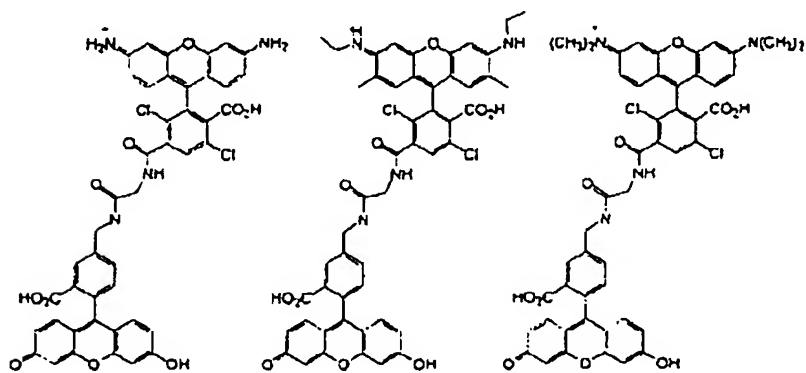
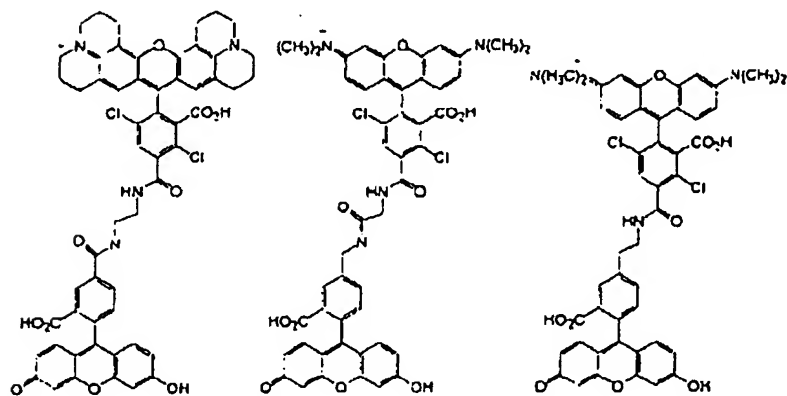
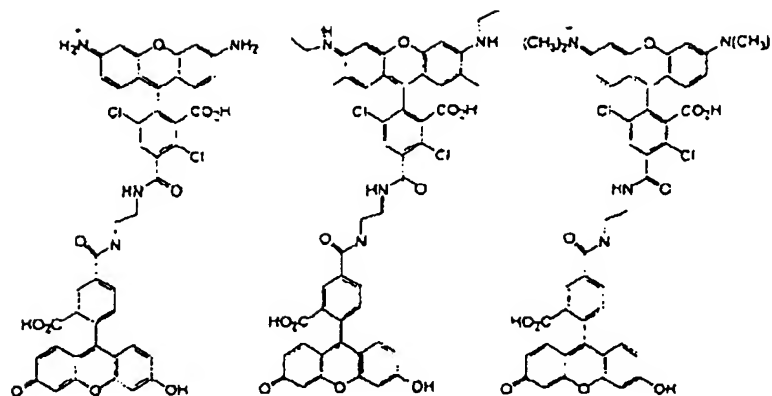
5TMR-gly-5AMF

【0074】



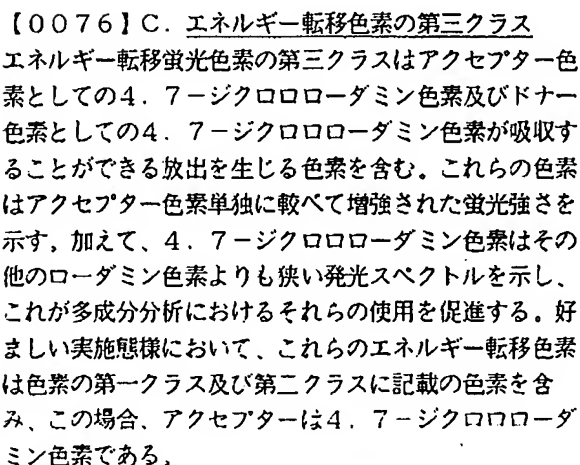
5TMR-5AMF

【化55】



【0075】

【化56】



4. 7-ジクロロローダミン色素化合物は一般構造式
【0077】

【0078】を有する、式中、 $R_1 \sim R_4$ は夫々独立に水素、アルキル、または R_1 と R_5 、 R_2 と R_5 、 R_3 と R_5 、 R_4 と R_5 が一緒にされて環を形成する場合、

及びこれらの組み合わせであり、 $R_5 \sim R_{13}$ は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシ、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニルもしくは置換フェニル、または隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせであり、 X_1 、 X_3 及び X_4 は夫々独立に水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシ、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、もしくはアルコキシ、または隣接置換基と一緒にされて環を形成する場合、及びこれらの組み合わせであり、かつ X_2 及び X_5 は塩素である。

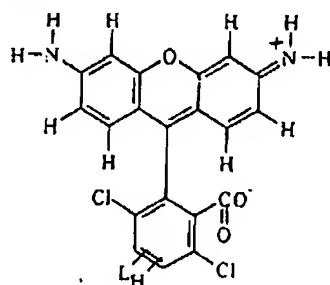
【0079】色素の4、7-ジクロロローダミンクラスの中に入る色素及びそれらの合成が“4、7-ジクロロローダミン色素”という発明の名称の1996年6月27日に出願された米国特許出願第08/672,196号に記載されており、その特許が参考として本明細書に含まれる。 $R_1 \sim R_4$ に関して、アルキル置換基は約1~8個の炭素原子を含んでもよく(即ち、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、tert-ブチル、sec-ブチル、ネオペンチル、tert-ペンチル等)、直鎖炭化水素部分及び分岐炭化水素部分であってもよい。好ましい実施態様において、 $R_1 \sim R_4$ は夫々独立に水素、メチル、またはエチルであり、更に好ましくは水素またはメチルである。 $R_5 \sim R_{10}$ に関して、アルキル置換基、アルケン置換基、アルキン置換基及びアルコキシ置換基は好ましくは約1~8個の炭素原子を含んでもよく(即ち、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、tert-ブチル、sec-ブチル、ネオペンチル、tert-ペンチル等)、直鎖炭化水素部分及び分岐炭化水素部分であってもよい。 $R_1 \sim R_{13}$ に関して、 R_1 と R_5 、 R_2 と R_6 、 R_3 と R_7 、 R_4 と R_8 は夫々独立に一緒にされて5員環、6員環、または7員環を形成してもよい。

【0080】一実施態様において、 R_6 及び R_7 はベンゾであり、かつ/または R_9 及び R_{10} はベンゾである。好ましい実施態様において、 $R_5 \sim R_{10}$ は夫々独立に水

素、メチル、またはエチルであり、更に好ましくは水素またはメチルである。 X_1 、 X_3 及び X_4 に関して、 X_1 は好ましくはカルボキシレートであり、かつ X_3 及び X_4 の一つは4、7-ジクロロローダミンアクセプター色素をドナー色素に結合し、またはヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドをエネルギー転移色素に結合するのに使用される置換基を含んでもよい。4'環位にある R_8 置換基はまたアクセプターをドナー色素またはヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドの如き生物分子に結合するのに使用し得る。本明細書中DR110-2と称される、本発明に使用し得る一つの特に好ましいアクセプター色素において、 $R_1 \sim R_{10}$ は別々にされて水素であり、 X_1 はカルボキシレートであり、 X_3 及び X_4 の一方は結合基(L)であり、他方は水素である。DR110-2の構造が以下に示される。

【0081】

【化58】

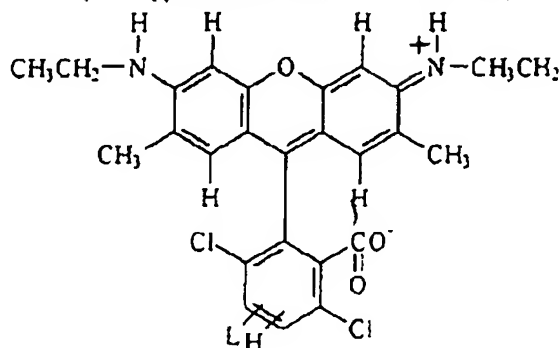


DR110-2

【0082】本明細書中DR6G-2と称される、本発明に使用し得る第二の特に好ましいアクセプター色素において、 R_1 及び R_2 の一方はエチルであり、他方は水素であり、 R_3 及び R_4 の一方はエチルであり、他方は水素であり、 R_5 及び R_6 は別々にされてメチルであり、 R_7 、 R_9 、及び R_{13} は水素であり、 X_1 はカルボキシレートであり、 X_3 及び X_4 の一方は結合基であり、他方は水素である。DR6G-2の構造が以下に示される。

【0083】

【化59】



DR6G-2

【0084】本明細書中DTMRと称される、本発明に使用し得る第三の特に好ましいアクセプター色素において、

$R_1 \sim R_5$ は別々にされて水素であり、 $Y_1 \sim Y_4$ は別々にされてメチルであり、 X_1 はカルボキシレートであ

例えば、ポリリン酸または硫酸中で180℃で12時間加熱される。粗色素4dが水への添加により沈殿され、遠心分離により単離される。対称生成物を生成するために、反応体4a及び4bの置換基は同じであるが、非対称生成物を生成するために、置換基は異なる。

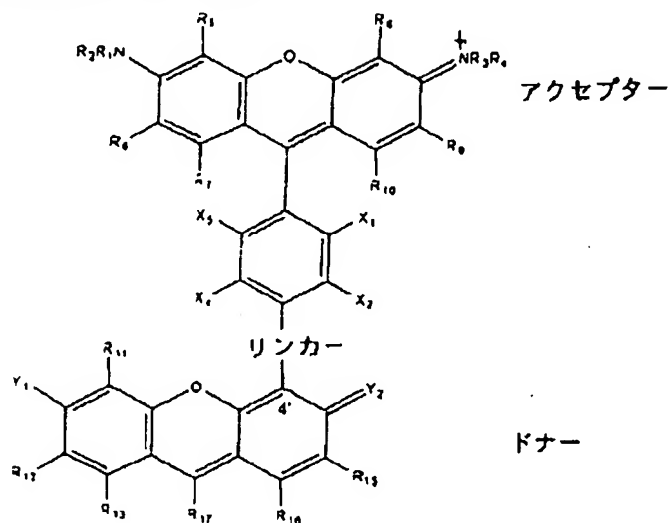
2. アクセプターとしての4,7-ジクロロローダミンを含むエネルギー転移色素

一般に、本発明のエネルギー転移色素は第一波長の光を吸収し、応答して励起エネルギーを放出するドナー色素、ドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長の蛍光を発することができる4,7-ジクロロローダミンアクセプター色素、及びドナー色素をアクセプター色素に形成するリンカーを含む。

4,7-ジクロロローダミン色素をアクセプター色素として使用する色素のこのクラスの好ましい例が表1に示される。色素のこのクラス中に使用し得るアクセプター色素の例として、先に説明されたようなDR110-2、DR6G-2、DTMR、DROX、並びに図3及び4に示された色素が挙げられるが、これらに限定されない。これらのエネルギー転移蛍光色素の一つのサブクラスは、アクセプター色素が4,7-ジクロロローダミン色素である本発明の色素の第一クラスの色素である。これらの色素の一般構造式が以下に示される。

【0091】

【化62】

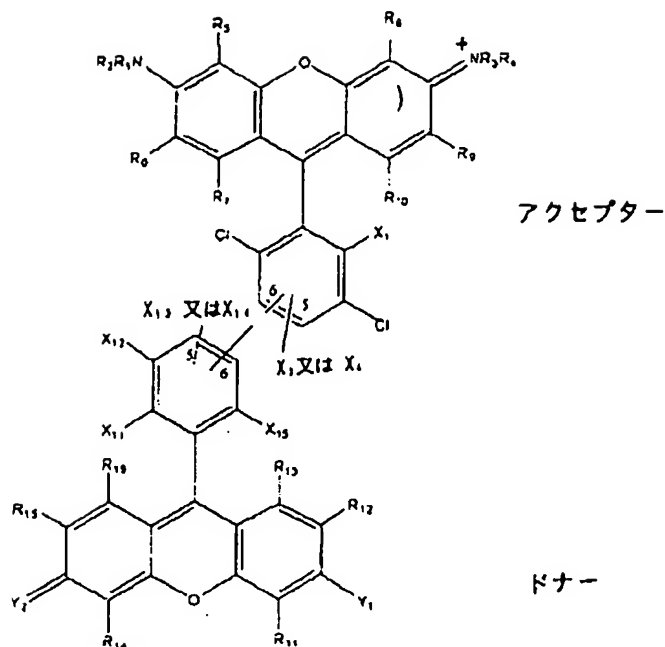


【0092】表4は4,7-ジクロロローダミンがアクセプター色素として使用される色素の第一クラスに属するエネルギー転移色素の例を示す。表4に示された色素は5-カルボキシフルオレセインドナー色素及びアクセプター色素としてのうまたは6カルボキシDTMRを含むが、多種のその他のキサンテン色素がドナー色素として容易に置換でき、多種のその他の4,7-ジクロロローダミン色素がDTMRアクセプター色素に代えて容易に置換し得ることが理解されるべきであることが注目され、ドナー色素及びアクセプター色素に関するこれらの変化の

全てが本発明の範囲内に入ることが意図されている。これらのエネルギー転移蛍光色素の別のサブクラスは、アクセプター色素が4,7-ジクロロローダミン色素である本発明の色素の第二クラスの色素である。ドナーキサンテン色素及びアクセプター4,7-ジクロロローダミン色素がドナー色素及びアクセプター色素の5環位または6環位で互いに結合されるこれらの色素の一般構造式が以下に示される。

【0093】

【化63】



【0094】上記のように、この実施態様において、ドナーをアクセプター色素に結合するリンカーは短く、かつ／または硬質であることが好ましい。何となれば、これがドナー色素とアクセプター色素の間のエネルギーの転移を増進することがわかったからである。先に示された置換基ラベルは、その他の色素に関して特定された置換基の同じグループに相当する。表5は4, 7-ジクロロロロダミンがアクセプター色素として使用される本発明のエネルギー転移色素の第二クラスの例を示す。表5に示された色素は5-アミノメチルフルオレセインドナー色素を含むが、多種のその他のキサンテン色素がドナー色素として容易に置換し得ることが理解されるべきであることが注目される。また、多種のその他の4, 7-ジクロロロロダミン色素が表5に示された色素に代えて容易に置換し得ることが理解されるべきである。何となれば、上記されたように、ドナー色素及びアクセプター色素に関するこれらの変化の全てが本発明の範囲内に入ることが意図されているからである。

D. エネルギー転移色素の第四クラス

本発明はまたドナー色素が色素のキサンテンクラスの一員であり、かつアクセプター色素が色素のキサンテンクラス、シアニンクラス、フタロシアニンクラスまたはスクアラインクラスの一員であるエネルギー転移蛍光色素の第四クラスに関する。エネルギー転移色素のこのクラス中で、ドナーは色素のフルオレセインクラスの一員であり、かつアクセプター色素が約600nm より大きい発光最大及び／またはドナー色素の吸光度最大よりも少なくとも約100nm 大きい発光最大を有することが好ましい。

【0095】本発明の色素の第四クラスは、ドナーの吸光度とアクセプターの発光の差により測定して、大きいストークシフトを通常示す。加えて、これらの色素は、最小ドナー蛍光が観察される点で有効なエネルギー転移

を示す。重要なことに、アクセプター色素の吸収スペクトルがドナー色素の発光スペクトルと重ならないとしても、エネルギーはこのクラスに属する色素の幾つかにおいてドナーからアクセプターに転移される。この実施態様に使用し得るアクセプター色素の例として、5-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)及びCy5 が挙げられるが、これらに限定されない。この実施態様のエネルギー転移色素はまたドナーをアクセプターに結合するリンカーを含む。ドナーをアクセプター色素に結合するのに使用されるリンカーは色素の第一クラス及び第二クラスのあらゆるリンカーであってもよい。しかしながら、別のリンカーが色素のこのクラス中に使用されてもよいことが予知される。

【0096】色素のこのクラスの一実施態様において、リンカーはドナー色素のキサンテン環構造の4' 位に結合される。リンカーは上記の一般構造式 $R_{21}Z_1C(O)R_{22}R_{29}$ (式中、 R_{21} はドナーキサンテン色素の4' 環位に結合されている C_{1-5} アルキルであり、 Z_1 はNH、硫黄または酸素であり、 $C(O)$ はカルボニル基であり、 R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合を有する5員環及び6員環またはカルボニル炭素に結合されている縮合環構造を含む置換基であり、かつ R_{29} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基である)を有することが好ましい。アクセプター色素が色素のキサンテンクラスの一員である場合、リンカーはキサンテン環構造の5位でアクセプターに結合されることが好ましい。表6は本発明の上記のエネルギー転移色素の例を示す。表6に示された色素は5-カルボキシフルオレセインドナー色素を含むが、多種のその他のキサンテン色素がドナー色素として容易に置換し得ることが理解されるべきであることが注目される。また、多種のその他のキサンテン色素、並びにシアニン色素、フタロシ

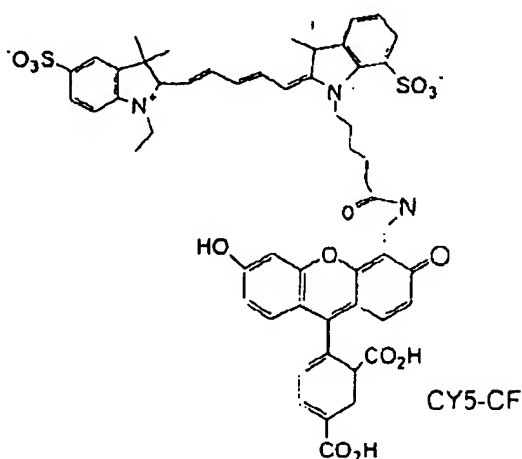
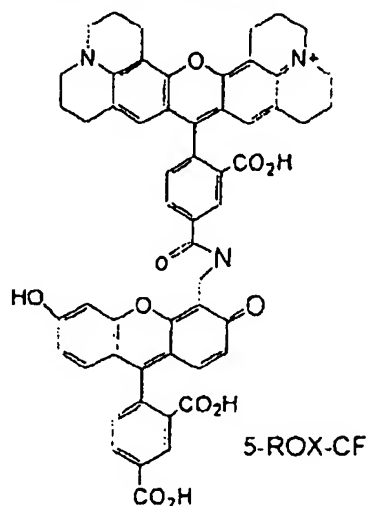
アニン色素及びスクアライン色素が上記された5-カルボキシROX及びCy5アクセプター色素に代えて容易に置換し得ることが理解されるべきである。ドナー色素及びアクセプター色素に関するこれらの変化の全てが本発明の範囲内に入る。この実施態様のエネルギー転移色素は、これらの色素を4色素DNA配列決定において小さいストークシフトを有する色素との使用に特に良く適しているようにする大きいストークシフトを通常示す。例えば、図7及び8は互いにスペクトル的に分解可能である4色素の2組を示す。図7中、5ROX-CFは上記色素の第四クラスの範囲内に入る色素である。一方、図8は両

方とも上記色素の第四クラスの範囲内に入る5ROX-CF及びCy5-CFを含む。

【0097】図8に示された5ROX-CF及びCy5-CFの発光スペクトルからわかるように、ドナー色素(5-カルボキシフルオレセイン、520nm)からの非常に小さい蛍光がこれらの色素中で観察される。これはドナー色素(フルオレセイン)の発光最大とアクセプター色素(ROX、590nm、Cy5、640nm)の吸光度最大の大きな差に鑑みて予期しない結果である。

【0098】

【化64】



【0099】II. 本発明のエネルギー転移色素を含む試薬

また、本発明は本発明のエネルギー転移蛍光色素を含む蛍光試薬に関する、節IIIに詳しく記載されるように、これらの試薬はサンプル中の成分の存在を検出するための多種の方法に使用し得る。本発明の蛍光試薬は、本発明のエネルギー転移色素が結合されて、エネルギー転移色素の蛍光に基いて試薬の存在を検出するのに使用し得るあらゆる分子または物質を含む。本発明の色素が試薬を生成するのに結合し得る分子及び物質の型として、タ

ンパク質、ポリペプチド、多糖、ヌクレオチド、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド類縁体(例えば、ペプチド核酸)、脂質、固体担体、有機ポリマー及び無機ポリマー、並びにこれらの組み合わせ及び群がり、例えば、染色体、核、生細胞、例えば、バクテリア、その他の微生物、哺乳類細胞、及び組織が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の試薬の好ましいクラスはヌクレオチド、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド類縁体(これらは本発明のエネルギー転移色素を含むように修飾されていた)

である。ヌクレオチド試薬及びヌクレオシド試薬に関する用途の例として、酵素合成により生成されたオリゴヌクレオチド標識、例えば、PCR増幅の状況で使用されるヌクレオシドトリホスフェート、サンガー型オリゴヌクレオチド配列決定、及びnick翻訳反応が挙げられるが、これらに限定されない。オリゴヌクレオチド試薬に関する用途の例として、DNA配列決定プライマー、PCRプライマー、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ等としての使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】試薬の一つの特別な実施態様は標識されたヌクレオシド(NTP)、例えば、本発明のエネルギー転移蛍光色素で標識された、シトシン、アデノシン、グアノシン、及びチミジンである。これらの試薬はオリゴヌクレオチド合成を伴う多種の方法に使用し得る。別の関連実施態様は標識されたヌクレオチド、例えば、モノー、ジー及びトリホスフェートヌクレオシドホスフェートエステルである。これらの試薬として、特に、本発明のエネルギー転移蛍光色素で標識された、デオキシヌクレオシドトリホスフェート(dNTP)、例えば、デオキシシトシントリホスフェート、デオキシアデノシントリホスフェート、デオキシグアノシントリホスフェート、及びデオキシチミジントリホスフェートが挙げられる。これらの試薬は、例えば、色素標識されたオリゴヌクレオチドの調製においてポリメラーゼ基質として使用し得る。また、これらの試薬として、本発明のエネルギー転移蛍光色素で標識された、ジデオキシヌクレオシドトリホスフェート(ddNTP)、例えば、ジデオキシシトシントリホスフェート、ジデオキシアデノシントリホスフェート、ジデオキシグアノシントリホスフェート、及びジデオキシチミジントリホスフェートが挙げられる。これらの試薬は、例えば、色素終止配列決定に使用し得る。

【0101】試薬の別の実施態様は本発明のエネルギー転移蛍光色素を含むオリゴヌクレオチドである。これらの試薬は、例えば、色素プライマー配列決定に使用し得る。本明細書に使用される“ヌクレオシド”は、例えば、Kornberg及びBaker, DNA Replication, 第二編(Freeman, San Francisco, 1992)に記載されたような2'-デオキシ形態及び2'-ヒドロキシル形態を含む、1'位でペントースに結合された、プリン、デアザプリン、またはピリミジンヌクレオシド塩基、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、デアザアデニン、デアザグアノシン等からなる化合物を表す。本明細書に使用される“ヌクレオチド”という用語はヌクレオチドのホスフェートエステル、例えば、モノ、ジ及びトリホスフェートエステルを表し、エステル化の最も普通の部位はペントースのC-5位に結合されたヒドロキシル基である。ヌクレオチドに関する“類縁体”として、例えば、Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)により一般に記載された、修飾塩基部分及

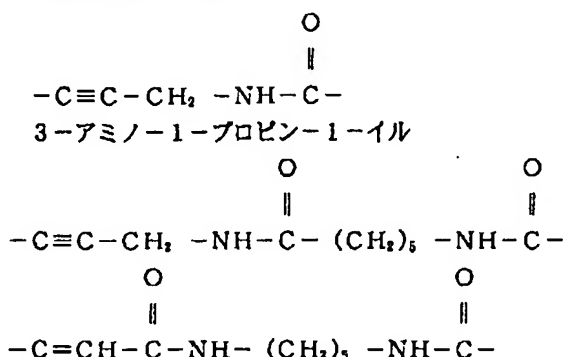
び/または修飾糖部分を有する合成ヌクレオシドが挙げられる。“標識されたヌクレオシド”及び“標識されたヌクレオチド”という用語は結合によりエネルギー転移色素に共有結合されているヌクレオシド及びヌクレオチドを表す。

【0102】本明細書に使用される“オリゴヌクレオチド”という用語は、二本鎖及び一本鎖のデオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、これらの α -アノマー形態等を含む、天然または修飾ヌクレオシドモノマーの線状ポリマーを表す。通常、ヌクレオシドモノマーはホスホジエステル結合により結合されており、本明細書に使用される場合、“ホスホジエステル結合”は、会合された対イオン、例えば、H、NH₄、Na等を含む(このような対イオンが存在する場合)、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホルアミデート等を含む、ホスホジエステル結合またはこれらの類縁体を表す。オリゴヌクレオチドはサイズが小さいモノマー単位、例えば、8-40から数千のモノマー単位までの範囲である。オリゴヌクレオチドが文字の配列、例えば、“ATGCCTG”により表される時はいつも、特にことわらない限り、ヌクレオチドが左から右に5'→3'の順序であり、“A”はデオキシアデノシンを表し、“C”はデオキシシチジンを表し、“G”はデオキシグアノシンを表し、また“T”はチミジンを表すことが理解されるであろう。ヌクレオシド標識は、既知の結合、結合基、及び関連相補性官能基を使用して多数の既知のヌクレオシド標識技術のいずれかを 사용하여行い得る。色素及びヌクレオシドを結合する結合は(i)オリゴヌクレオチド合成条件に安定であり、(ii)オリゴヌクレオチド-標的ハイブリダイゼーションに干渉せず、(iii)関係する酵素、例えば、ポリメラーゼ、リガーゼ等と適合性であり、かつ(iv)色素の蛍光を消光しないものであるべきである。

【0103】色素はピリミジン塩基の5-炭素及び7-デアザプリン塩基の7-炭素に共有結合されることが好ましい。本発明に使用し得る幾つかの好適な塩基標識操作が、例えば、Gibsonら, Nucleic Acids Research, 15 6455-6467 (1987)、Gebeyehuら, Nucleic Acids Research, 15 4513-4535 (1987)、Haralambidisら, Nucleic Acids Research, 15 4856-4876 (1987)、Nelsonら, Nucleosides and Nucleotides, 5(3) 233-241 (1986)、Bergstromら, JACS, 111 374-375 (1989)、米国特許第4,855,225号、同第5,231,191号、及び同第5,449,767号に報告されており、これらの夫々が参考として本明細書に含まれる。結合はアセチレンアミド結合またはアルケンアミド結合であることが好ましく、色素とヌクレオチド塩基の結合は色素の活性化N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルをヌクレオチドのアルキニルアミノ、アルキニルエトキシアミノまたはアルケニルア

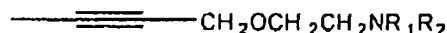
ミノ誘導体化塩基と反応させることにより形成される。得られる結合はプロパルギル-1-エトキシアミド(3-(アミノ)エトキシ-1-プロピニル)、3-(カルボキシ)アミノ-1-プロピニルまたは3-アミ

ノ-1-プロピニ-1-イルであることが更に好ましい。本発明の色素をヌクレオシド塩基に結合するのに好ましい幾つかの結合が以下に示される。



【0104】

【化65】



【0105】(式中、 R_1 及び R_2 は別々にされてH、アルキル、保護基または蛍光色素である)

アルキニルアミノ誘導体化ヌクレオシドの合成がHobbsらの欧州特許出願第87305844.0号、及びHobbsら、J. Org. Chem., 54 3420 (1989) により教示されており、これが参考として本明細書に含まれる。簡単に言えば、アルキニルアミノ誘導体化ヌクレオチドが、適当なハロジデオキシヌクレオシド(通常、Hobbsら(先に引用した)により教示されたような5'-ヨードピリミジン及び7'-ヨード-7'-デアザプリンジデオキシヌクレオシド)及びCu(I)をフラスコに入れ、アルゴンでフラッシュして空気を除去し、乾燥DMFを添加し、続いてアルキニルアミン、トリエチルアミン及びPd(0)を添加することにより生成される。その反応混合物は数時間にわたって、または薄層クロマトグラフィーがハロジデオキシヌクレオシドの消費を示すまで、攪拌し得る。保護されていないアルキニルアミンが使用される場合、アルキニルアミノヌクレオシドは、反応混合物を濃縮し、カップリング反応で生じたヒドロハライドを中和するために水酸化アンモニウムを含む溶離溶媒を使用してシリカゲルによるクロマトグラフィーにかけることにより単離し得る。保護されたアルキニルアミンが使用される場合、メタノール/塩化メチレンが反応混合物に添加でき、続いて強塩基性陰イオン交換樹脂の重炭酸塩形態が添加し得る。次いでスラリーが約45分間にわたって攪拌され、濾過され、樹脂が追加のメタノール/塩化メチレンですすぐられる。合わせた濾液が濃縮され、メタノール-塩化メチレン勾配を使用してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーにより精製し得る。トリホスフェートが通常の技術により得られる。

【0106】本発明のエネルギー転移色素で標識されたオリゴヌクレオチドの合成は、既知の結合、結合基、及び関連相補性官能基を使用する多数の既知のオリゴヌ

レオチド標識技術のいずれかを使用して行い得る。例えば、標識されたオリゴヌクレオチドは、例えば、DNAポリメラーゼまたはリガーゼを使用して酵素合成でき

(例えば、Stryer, Biochemistry, 24章, W.H. Freeman and Company (1981))、または化学合成、例えば、ホスホルアミジト方法、ホスファイトトリエステル方法等(例えば、Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (1990))により合成し得る。標識は酵素合成中に標識されたヌクレオシドトリホスフェートモノマーを使用して導入されてもよく、または化学合成中に標識された非ヌクレオチドまたはヌクレオチドホスホルアミジトを使用して導入されてもよく、または合成後に導入されてもよい。一般に、標識されたオリゴヌクレオチドが酵素合成を使用してつくられる場合、下記の操作が使用し得る。鋳型DNAが変性され、オリゴヌクレオチドプライマーが鋳型DNAにアニールされる。デオキシヌクレオシドトリホスフェートの混合物がdGTP、dATP、dCTP、及びdTTPを含む反応液に添加され、デオキシヌクレオチドの一種の少なくとも一部が上記の本発明の色素化合物で標識される。次に、ポリメラーゼ酵素がポリメラーゼ酵素が活性である条件下で添加される。標識されたポリヌクレオチドがポリメラーゼストランド合成中に標識されたデオキシヌクレオチドのとり込みにより生成される。別の酵素合成方法において、2種のプライマー、即ち、+ストランドに相補性の一種のプライマー及び標的の-ストランドに相補性の別のプライマーが一種に代えて使用され、ポリメラーゼは熱安定性ポリメラーゼであり、反応温度が変性温度と延長温度の間でサイクルされ、それによりPCR、例えば、PCR Protocols, Innisら編集, Academic Press (1990) により標的配列の標識された補体を指數的に合成する。

【0107】一般に、標識されたオリゴヌクレオチドが化学合成を使用してつくられる場合、ホスホルアミジト方法が使用されることが好ましい。ホスホルアミジト化合物及びポリヌクレオチド合成のホスホルアミジト方法は、有効かつ迅速なカップリング並びに出発物質の安定

性的ためにオリゴヌクレオチドを合成するのに好ましい。その合成は固体担体に結合された成長するオリゴヌクレオチド鎖で行われ、その結果、液相中にある過剰の試薬が過剰により容易に除去でき、それによりサイクル間の精製工程の必要をなくす。ヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドを標識する際のホスホルアミジト試薬の実用性に鑑みて、本発明はまた本発明のエネルギー転移色素を含むホスホルアミジト化合物に関する。ホスホルアミジト方法によりオリゴヌクレオチドを生成するのに使用される化学の詳細な説明がCaruthersらの米国特許第4,458,066号、Caruthersらの米国特許第4,415,732号、Caruthersら、Genetic Engineering, 4 1-17 (1982)、Users Manual Model 392及び394 Polynucleotide Synthesizers, 6-1~6-22頁、Applied Biosystems, Part No.901237 (1991) に示されており、これらの夫々が参考としてそのまま含まれる。

【0108】以下に、ホスホルアミジト方法を使用する典型的なオリゴヌクレオチド合成サイクルの工程を簡単に記載する。まず、保護されたヌクレオチドモノマーを含む固体担体を酸、例えば、トリクロロ酢酸で処理して5'-ヒドロキシル保護基を除去し、その後のカップリング反応のためにヒドロキシルを遊離する。次いで保護されたホスホルアミジトヌクレオシドモノマー及び弱酸、例えば、テトラゾールをその反応に同時に添加することにより活性化中間体を生成する。弱酸はホスホルアミジトの窒素をプロトン化して反応性中間体を生成する。ヌクレオシド添加は30秒以内に完結する。次に、ヌクレオシド付加を受けなかったポリヌクレオチド鎖を終端するキャッピング工程を行う。キャッピングは無水酢酸及び1-メチルイミダゾールを用いて行われることが好ましい。次いでヌクレオチド内結合を、好ましい酸化剤としてヨウ素を使用し、酸素ドナーとして水を使用する酸化によりホスファイトから更に安定なホスホリエステルに変換する。酸化後、ヒドロキシル保護基をプロトン酸、例えば、トリクロロ酢酸またはジクロロ酢酸で除去し、鎖伸長が完結するまでそのサイクルを繰り返す。合成後、塩基、例えば、水酸化アンモニウムまたはトリアルアミンを使用してポリヌクレオチド鎖を担体から開裂する。また、開裂反応はホスフェート保護基、例えば、シアノエチルを除去する。最後に、塩基のエキソ環アミンの保護基及び色素のヒドロキシル保護基を、そのポリヌクレオチド溶液を高温、例えば、55°Cで塩基中で処理することにより除去する。

【0109】ホスホルアミジトヌクレオシドモノマーのいずれかは色素標識されたホスホルアミジトであってもよい。ヌクレオチドの5'-末端位置が標識される場合、本発明の標識された非ヌクレオチドホスホルアミジトが最終縮合工程中使用し得る。オリゴヌクレオチドの内部位置が標識される場合、本発明の標識されたヌクレオチドホスホルアミジトが縮合工程のいずれか中使用し

得る。それらの合成に続いて、オリゴヌクレオチドは5'末端を含む幾つかの位置で標識し得る。Oligonucleotides and Analogs, Eckstein編集, 8章, IRL Press (1991)及びOrgelら, Nucleic Acids Research 11(18) 6513 (1983)、米国特許第5,118,800号を参照のこと。これらの文献の夫々が参考として含まれる。オリゴヌクレオチドはまたそれらのホスホジエステル主鎖(Oligonucleotides and Analogs, Eckstein 編集, 9章)または3'末端(Nelson, Nucleic Acids Research 20(23) 6253-6259、及び米国特許第5,401,837号及び同第5,141,813号)で標識されてもよく、両方の特許が参考として本明細書に含まれる。オリゴヌクレオチド標識操作の総説について、R.Haugland Excited States of Biopolymers, Steiner 編集, Plenum Press, NY (1983)を参照のこと。一つの好ましい合成後の化学標識方法において、オリゴヌクレオチドは以下のようにして標識される。約1当量の1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド及び約3当量のn-ヒドロキシスクシンイミドを乾燥酢酸エチル中で室温で3時間反応させることにより、カルボキシ結合基を含む色素をn-ヒドロキシスクシンイミドエステルに変換する。反応混合物を5%のHClで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、過剰し、固体に濃縮し、これをDMSO中に再度懸濁させる。次いでDMSO色素原液をpH 9.4の0.25Mの重炭酸塩/炭酸塩緩衝液中のアミノヘキシル誘導体化オリゴヌクレオチドに過剰(10-20x)に添加し、6時間反応させる(例えば、米国特許第4,757,141号)。色素標識されたオリゴヌクレオチドをサイズ排除クロマトグラフィーカラム中の通過により未反応色素から分離し、緩衝液、例えば、0.1モルのトリエチルアミンアセテート(TEAA)で溶離する。粗標識オリゴヌクレオチドを含むフラクションを勾配溶離を使用して逆相HPLCにより更に精製する。

【0110】III. 本発明の色素及び試薬を使用する方法
本発明のエネルギー転移色素及び試薬は、サンプル中の成分を色素を含む試薬で標識することによりサンプル中の成分を検出する多種の方法に使用し得る。特に、本発明のエネルギー転移色素及び試薬は、分離技術及び蛍光検出技術を組み合わせる方法、特に多種の空間上重なる分析物の同時検出を必要とする方法における使用に良く適している。例えば、色素及び試薬は生化学的分離操作、例えば、電気泳動にかけられたオリゴヌクレオチドのクラスを検出するのに特に良く適しており、この場合、同様の物理化学的性質、例えば、サイズ、配座、電荷、疎水性等を有する標的物質の一連のバンドまたはスポットが線形配列または平面配列で存在する。本明細書に使用される“バンド”という用語は同様または同一の物理化学的性質に基づく分析物の空間上のグルーピングまたは凝集を含む。通常バンドは電気泳動による色素-オリゴヌクレオチド接合体の分離において生じる。オリゴヌクレオチドのクラスは種々の状況で生じ得る。本明細

書中“フラグメント分析”方法または“遺伝子分析”方法と称される方法の好ましいカテゴリーにおいて、標識されたオリゴヌクレオチドフラグメントは、例えば、結合またはポリメラーゼ誘導プライマー延長により、標識されたプライマーまたはヌクレオチドを使用する鋳型誘導酵素合成により生成される。フラグメントはサイズ依存性分離方法、例えば、電気泳動またはクロマトグラフィーにかけられ、分離されたフラグメントが分離に続いて、例えば、レーザー誘導蛍光により検出される。特に好ましい実施態様において、オリゴヌクレオチドの複数のクラスが同時に分離され、異なるクラスがスペクトル的に分解可能な標識により区別される。

【0111】一つのこのようなフラグメント分析方法は増幅されたフラグメント長さ多形性検出(AmpFLP)であり、増幅されたフラグメント長さ多形性、即ち、PCRにより増幅される制限フラグメント長さ多形性に基いている。種々のサイズのこれらの増幅されたフラグメントはファミリー中の変異体遺伝子を追跡するための結合されたマーカーとして利用できる。増幅されたフラグメントが染色体に関して変異体遺伝子に近似している程、連鎖相関関係が高い。多くの遺伝子疾患の遺伝子は同定されていなかったため、これらの連鎖マーカーは疾患のリスクまたは起源を評価することを助けるのに利用できる。AmpFLP技術において、ポリヌクレオチドは標識されたオリゴヌクレオチドPCRプライマーを使用することにより、または標識されたヌクレオチドトリホスフェートをPCRで使用することにより標識し得る。別のフラグメント分析方法はnick翻訳である。nick翻訳は二本鎖DNA分子中の未標識ヌクレオチドトリホスフェートを標識されたヌクレオチドトリホスフェートで置換する反応を伴う。遊離3'-ヒドロキシル基がデオキシリボヌクレアーゼI(DNAaseI)処理により生じた“nck”により未標識DNA内に生成される。次いでDNAポリメラーゼIはnickの3'-ヒドロキシル末端への標識されたヌクレオチドの付加を触媒する。同時に、この酵素の5' to 3'-エキソヌクレアーゼ活性がnickの5'-ホスホリル末端からヌクレオチド単位を排除する。遊離3'-OH基を有する新しいヌクレオチドが初期の切除されたヌクレオチドの位置にとり込まれ、nickが3'方向に一つのヌクレオチド単位だけシフトされる。この3'シフトが既存の未標識ヌクレオチドの除去によりDNAへの新しい標識されたヌクレオチドの連続的付加をもたらすであろう。次いでnick翻訳されたポリヌクレオチドが分離方法、例えば、電気泳動を使用して分析される。

【0112】別の例示のフラグメント分析方法は可変数のタンデムリピート、またはVNTRに基いている。VNTRは特別な配列の隣接多重コピーを含む二本鎖DNAの領域であり、反復単位の数が可変である。VNTR遺伝子座の例はpVN22、pMCT118、及びApo Bである。VNTR方法のサブセットはマイクロサテライトリピート、または短いタン

デムリピート(STR)、即ち、短い(2-4塩基)反復配列を特徴とするDNAのタンデムリピートの検出に基づく方法である。ヒトにおける最も多い点に在る反復DNAファミリーの一つは(dC-dA)_n-(dG-dT)_nジヌクレオチドリピートファミリー(また(CA)_nジヌクレオチドリピートファミリーと称される)である。これらはヒトゲノム中の50,000~100,000程度の多い(CA)_nリピート領域であると考えられ、典型的にはブロック当たり15~30のリピートを有する。これらのリピートの多くは長さが多形性であり、それ故、有益な遺伝子マーカーとして利用できる。VNTR方法またはSTR方法において、標識は色素標識されたPCRプライマーを使用することによりポリヌクレオチドフラグメントに導入されることが好ましい。別の例示のフラグメント分析方法はDNA配列決定である。一般に、DNA配列決定はオリゴヌクレオチドプライマーの延長/終止反応を伴う。プライマーを延長するのに使用されるデオキシヌクレオシドトリホスフェート(dNTP)が反応混合物中に含まれる。また、延長されたプライマーにとり込まれた時に、プライマーの更なる延長を阻止する少なくとも一種のジデオキシヌクレオシドトリホスフェート(ddNTP)が反応混合物中に含まれる。延長反応が停止された後、異なるヌクレオシドの位置決りを測定するために、生成される異なる終止生成物が分離され、分析される。

【0113】蛍光DNA配列決定は一般に二つのカテゴリー、“色素プライマー配列決定”と“色素ターミネーター配列決定”に分けられる。色素プライマー配列決定において、蛍光色素は延長されるプライマーにとり込まれる。次いで4つの別々の延長/終止反応が平行して行われ、夫々の延長反応は延長反応を終止するための異なるジデオキシヌクレオシドトリホスフェート(ddNTP)を含む。終止後に、反応生成物がゲル電気泳動により分離され、分析される。例えば、Ansorgeら、Nucleic Acids Res. 15 4593-4602 (1987)を参照のこと。色素プライマー配列決定の一つの変化において、異なるプライマーが4つの別々の延長/終止反応に使用され、夫々のプライマーが異なるスペクトル的に分解可能な色素を含む。終止後に、4つの延長/終止反応からの反応生成物が溜められ、電気泳動により分離され、単一レーン中で検出される。例えば、Smithら、Nature 321 674-679 (1986)を参照のこと。こうして、色素プライマー配列決定のこの変化において、スペクトル的に分解可能な色素の組を含むプライマーを使用することにより、一つより多い延長/終止反応からの生成物が同時に検出し得る。色素ターミネーター配列決定において、蛍光色素はジデオキシヌクレオシドトリホスフェートの夫々に結合される。次いで延長/終止反応が行われ、この場合、プライマーは、標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートが延長されたプライマーにとり込まれてプライマーの更なる延長を阻止するまで、デオキシヌクレオシドトリ

ホスフェートを使用して延長される。一旦終止されると、夫々のジデオキシヌクレオシドトリホスフェートに関する反応生成物が分離され、検出される。一実施態様において、別々の延長/終止反応が4種のジデオキシヌクレオシドトリホスフェートの夫々について行われる。別の実施態様において、単一の延長/終止反応が行われ、これは4種のジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを含み、夫々が異なるスペクトル的に分解可能な蛍光色素で標識されている。

【0114】こうして、本発明の一局面によれば、本発明の一種以上のオリゴヌクレオチド試薬を使用して色素プライマー配列決定を行う方法が提供される。この方法によれば、延長された標識されたプライマーの混合物が核酸配列をデオキシヌクレオシドトリホスフェート、少なくとも一種のジデオキシヌクレオシドトリホスフェート及びDNAポリメラーゼの存在下で蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリッドを形成することにより生成される。蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーは配列決定される核酸配列の一部に相補性のオリゴヌクレオチド配列と、オリゴヌクレオチドに結合されたエネルギー転移蛍光色素を含む。その方法によれば、DNAポリメラーゼは、ジデオキシヌクレオシドトリホスフェートがとり込まれて、これがプライマーの延長を終止するまで、デオキシヌクレオシドトリホスフェートでプライマーを延長する。終止後、延長されたプライマーの混合物が分離される。次いで核酸の配列が、生成された延長されたプライマーの混合物を蛍光検出することにより測定される。この方法の更に別の実施態様において、4つの色素プライマー配列決定反応が行われ、夫々のプライマー配列決定反応が異なる蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーと異なるジデオキシヌクレオシドトリホスフェート(ddATP、ddCTP、ddGTP及びddTTP)を含む。4つの色素プライマー配列決定反応が行われた後、延長されたプライマーの得られる混合物が溜められてよい。次いで延長されたプライマーの混合物が、例えば、電気泳動により分離され、核酸配列の配列を決定するために4種の異なる蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプライマーの夫々からの蛍光シグナルが検出される。

【0115】本発明の更に別の局面によれば、本発明のエネルギー転移色素で標識された一種以上のジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを使用して色素ターミネーター配列決定を行う方法が提供される。この方法によれば、延長されたプライマーの混合物が、核酸配列をデオキシヌクレオシドトリホスフェート、少なくとも一種の蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドトリホスフェート及びDNAポリメラーゼの存在下でオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリッドを形成することにより生成される。蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドトリホスフェートは本発明のエネルギー転移蛍光色素で標識

されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを含む。この方法によれば、DNAポリメラーゼは、標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートが延長されたプライマーにとり込まれるまでプライマーをデオキシヌクレオシドトリホスフェートで延長する。終止後、延長されたプライマーの混合物が分離される。次いで核酸配列の配列が延長されたプライマーに結合された蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを検出することにより決定される。この方法の更に別の実施態様において、延長されたプライマーの混合物を生成する工程が、核酸配列を4種の異なる蛍光標識されたジデオキシヌクレオシドトリホスフェート、即ち、蛍光標識されたジデオキシシトシントリホスフェート、蛍光標識されたジデオキシアデノシントリホスフェート、蛍光標識されたジデオキシグアノシントリホスフェート、及び蛍光標識されたジデオキシチミジントリホスフェートとハイブリッドを形成することを含む。

【0116】上記フラグメント分析方法の夫々において、標識されたオリゴヌクレオチドは電気泳動操作により分離されることが好ましい。例えば、先に引用されたGould及びMatthews、Rickwood及びHames、編集、Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach, (IRL Press Limited, London, 1981)、またはOsterman、Methods of Protein and Nucleic Acid Research, 1巻 Springer-Verlag, Berlin, 1984)を参照のこと。電気泳動マトリックスの型は約2~20重量%の濃度(重量対容積)を有する架橋または未架橋ポリアクリルアミドである。ポリアクリルアミド濃度は約4~8%であることが更に好ましい。好ましくは特にDNA配列決定の状況下で、電気泳動マトリックスはストランド分離剤または変性剤、例えば、尿素、ホルムアルデヒド等を含む。このようなマトリックスをつくるための詳細な操作がManiatisら、"98%のホルムアルデヒドまたは7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル中の低分子量DNA及びRNAの分別", Methods in Enzymology, 65 299-305 (1980)、Maniatisら、"ポリアクリルアミドゲル電気泳動による小さい二本鎖及び一本鎖DNA分子の鎖長測定", Biochemistry, 143787-3794 (1975)、Maniatisら、分子クローニング: 実験マニュアル(Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982), 179-185頁、及びABI PRISM™ 377DNA Sequencer User's Manual, Rev.A, 1995年1月, 2章(p/n 903433, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA)により示されており、これらの夫々が参考として含まれる。特別な分離に使用される最適のポリマー濃度、pH、温度、変性剤の濃度等は、分離すべき核酸のサイズ範囲、それらの塩基組成(それらが一本鎖または二本鎖であるかを問わない)、及び情報が電気泳動により探究されるクラスの性質を含む、多くの因子に依存する。それ故、本発明の適用は特別な分離の条件を最適化するために通常の前備試験を必要とし

得る。例えば、約20~300塩基の範囲のサイズを有するオリゴヌクレオチドが以下のマトリックス中で本発明に従って分離され、検出された。トリス・ボレートEDTA緩衝液、pH8.3中で生成された、19部対1部のアクリルアミド対ビス・アクリルアミドからつくられた6%のポリアクリルアミド。

【0117】電気泳動分離後、色素-オリゴヌクレオチド接合体が色素標識されたポリヌクレオチドからの蛍光放出を測定することにより検出される。このような検出を行うために、標識されたポリヌクレオチドが通常の手段、例えば、強力水銀蒸気ランプ、レーザー等により照射される。照射手段は488~550nmの波長の照射ビームを有するレーザーであることが好ましい。色素-ポリヌクレオチドはアルゴンイオンレーザーにより生じたレーザー光、特にアルゴンイオンレーザーの488及び514nmの放出線、またはネオジムソリッドステートYAGレーザーの532放出線により照射されることが更に好ましい。これらの線で同時にレーザーとして使える幾つかのアルゴンイオンレーザーが市販されており、例えば、Cyonic s, Ltd (Sunnyvale, Calif.) のモデル2001等が市販されている。次いで蛍光が感光性検出器、例えば、光電子増倍管、充電されたカップリング装置等により検出される。

【0118】IV. エネルギー転移色素を含むキット

また、本発明はエネルギー転移蛍光色素及び/または試薬の組み合わせを有するキットに関する。一実施態様において、キットは本発明の少なくとも2種のスペクトル的に分解可能なエネルギー転移色素を含む。このキットにおいて、エネルギー転移色素は、単一光源が色素を励起するのに必要とされるように同じドナー色素を含むことが好ましい。別の実施態様において、キットはジデオキシシトシントリホスフェート、ジデオキシアデノシントリホスフェート、ジデオキシグアノシントリホスフェート、及びジデオキシチミジントリホスフェートを含み、夫々のジデオキシヌクレオチドトリホスフェートが本発明のエネルギー転移色素で標識される。一実施態様において、夫々のエネルギー転移色素はその他のジデオキシヌクレオチドトリホスフェートに結合されたその他のエネルギー転移色素からスペクトル的に分解可能である。このキットにおいて、エネルギー転移色素は同じ第一キサンテン色素を含むことが好ましい。更に別の実施

態様において、キットは少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを含み、夫々のオリゴヌクレオチドが本発明のエネルギー転移色素を含む。一実施態様において、夫々のオリゴヌクレオチドはその他のオリゴヌクレオチドに結合されたエネルギー転移色素からスペクトル的に分解可能であるエネルギー転移色素を含む。別の実施態様において、キットは少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含み、これらが夫々スペクトル的に分解可能であるエネルギー転移色素を含む。エネルギー転移蛍光色素及びDNA配列決定におけるそれらの使用が以下の実施例により説明される。上記の目的及び利点以外の目的及び利点がこれらの実施例から明らかになるであろう。

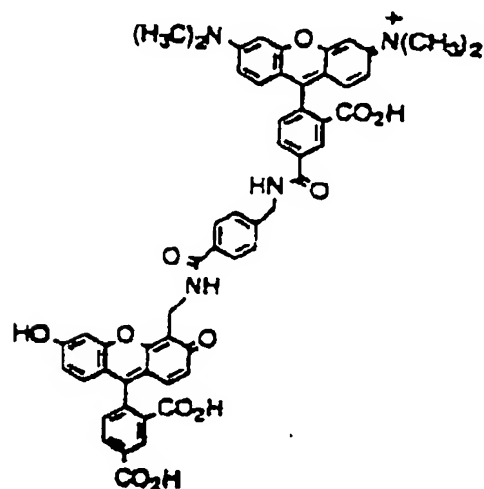
【0119】

【実施例】

1. 5TMR-B-CF の合成

【0120】

【化66】

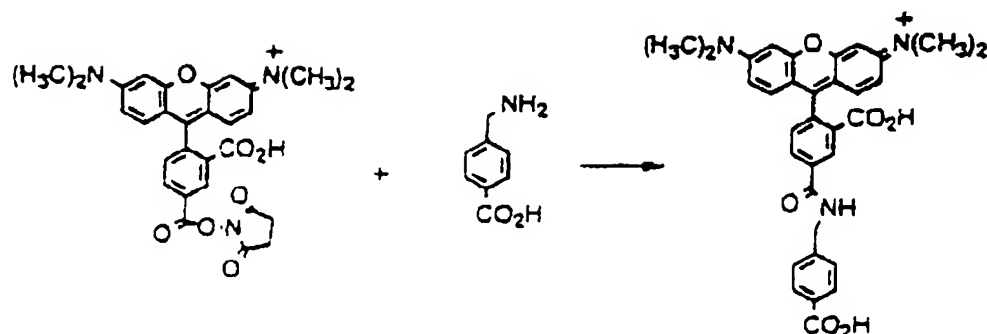


【0121】5-TMR NHS 及び4'-アミノメチル-5-カルボキシフルオレセインから実施例1A-Cに記載された反応順序に従って5TMR-B-CF を合成した。次いで5TMR-B-CF を1Dに記載された反応順序に従って5TMR-B-CF-NHS に変換し、その結果、色素をヌクレオチド、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマーにカップリングすることができた。

A. 5-TMR-B の合成

【0122】

【化67】



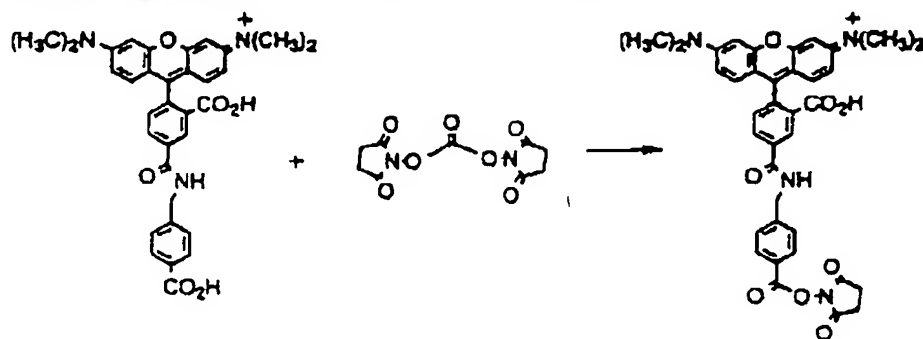
【0123】4-アミノメチル安息香酸(3mg、19 μ モル)、5-TMR NHS(5mg、9 μ モル)及びトリエチルアミン(20 μ L)の混合物を1.5 mLのエッペンドルフ管中でジメチルホルムアミド(DMF、200 μ L)中に懸濁させた。その混合物を10分間にわたって60°Cに加熱した。反応の進行をジクロロメタン、メタノール及び酢酸の400/30/10混合物で溶離してシリカゲルによる薄層クロマトグラフィー(TLC)により監視した。不溶性4-アミノメチル安

息香酸を遠心分離により分離し、DMF 溶液を5%のHCl(1mL)にデカントした。不溶性5-TMR-Bを遠心分離により分離し、5%のHCl(2x1mL)で洗浄し、真空遠心分離機中で乾燥させた。生成物をDMF(200 μ L)に溶解し、5-TMR-B-NHSを調製するのに使用した。

B. 5-TMR-B-NHS の合成

【0124】

【化68】



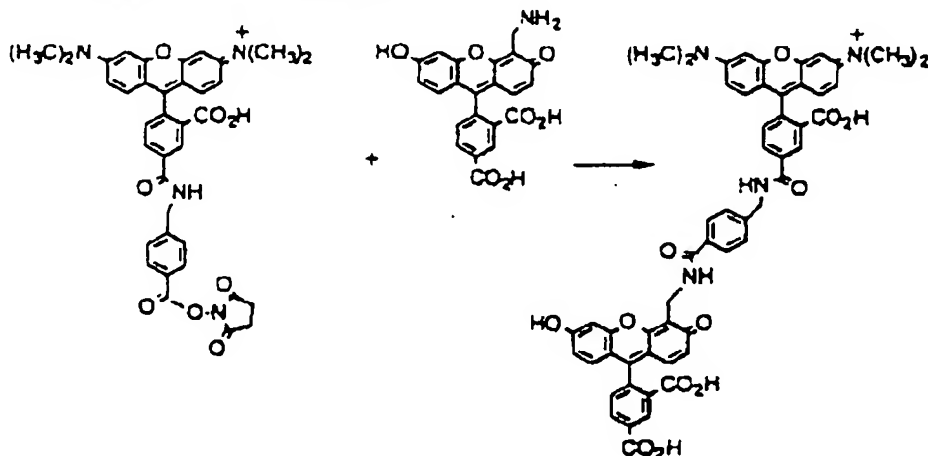
【0125】DMF(125 μ L)中の5-TMR-Bの溶液、ジイソプロピルエチルアミン(10 μ L)及びジスクシンイミジルカーボネート(10mg)を1.5 mLのエッペンドルフ管中で合わせ、60°Cに加熱した。反応の進行をジクロロメタン、メタノール及び酢酸の600/60/16 混合物で溶離してシリカゲルによるTLC により監視した。5分後、反応は完結したことが明らかであった。その溶液を塩化メチレン(3 mL)中で希釈し、250mMの炭酸塩/重炭酸緩衝液(pH 9、4x1mL)で洗浄し、乾燥させ(Na_2SO_4)、真空遠心分

離機で濃縮、乾燥させた。固体をDMF(100 μ L)に溶解した。アリコートにpH9 の緩衝液中で希釈し、552nm における吸光度を測定することにより収率を測定した。50,000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ の吸光率を使用して、5-TMR-B-NHSの濃度は4.8 mMであった。5-TMR NHSからの収率は8%であった。

C. 5-TMR-B-CFの合成

【0126】

【化69】



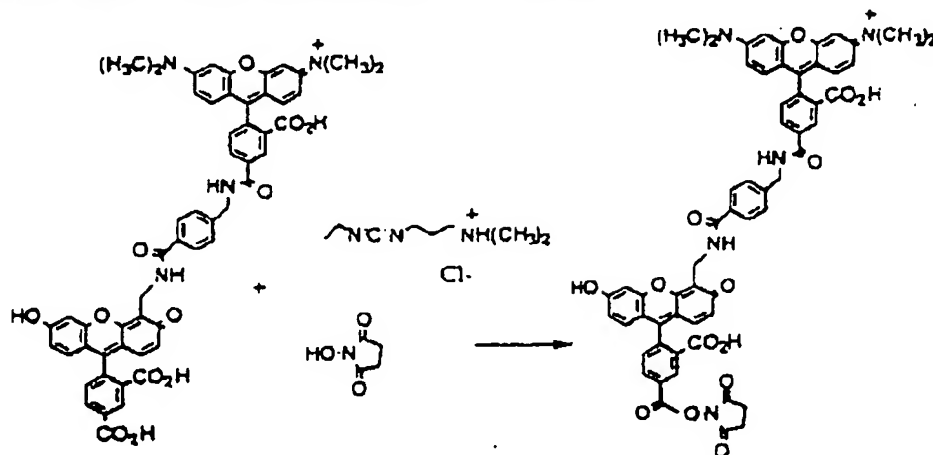
【0127】5TMR-B-NHSの溶液(250 μ LのDMF中1 μ モル)を1.5 mLのエッペンドルフ管中で4'-アミノメチル-5-カルボキシフルオレセインの溶液(CF、100 μ LのDMSO中2.2 μ モル)及びトリエチルアミン(20 μ L)と合わせた。15%~35%のアセトニトリル対0.1Mのトリエチルアンモニウムアセートの勾配溶離によりC8逆相カラムを使用するHPLCにより反応を監視した。HPLC分析は、5TMR-B-NHSが消費され、過剰の未反応のCFを残し

たことを示した。反応を5%のHCl(1mL)で希釈し、生成物を遠心分離により分離し、未反応のCFを水相中に残した。固体を5%のHCl(4x1mL)で洗浄し、真空遠心分離機中で乾燥させ、DMF(300 μ L)に吸収させた。収率は定量的であった。

D. 5-TMR-B-CF-NHSの合成

【0128】

【化70】



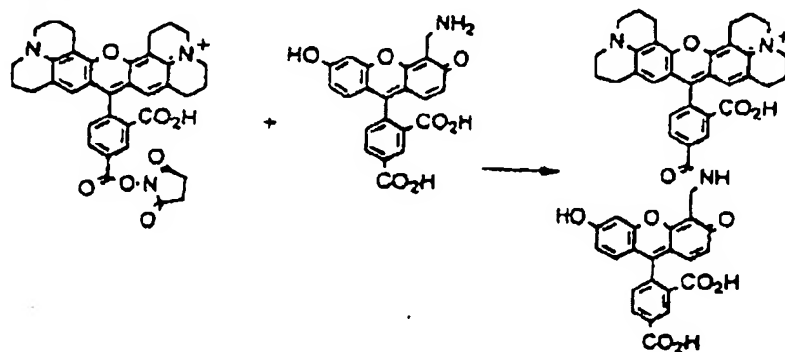
【0129】5TMR-B-CFの溶液(100 μ LのDMF中0.6 μ モル)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(DEC、2mg)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(4mg)を1.5 mLのエッペンドルフ管中で合わせた。その混合物を素早く音波処理し、60°Cに加熱した。反応をジクロロメタン、メタノール及び酢酸の600/60/16混合物で溶離してシリカゲルによるTLCに

より監視した。反応は30分間で完結し、5%のHClで希釈した。生成物を遠心分離により分離し、真空遠心分離機中で乾燥させた。活性化色素をDMF(20 μ L)に溶解した。

2. 5ROX-CFの合成

【0130】

【化71】



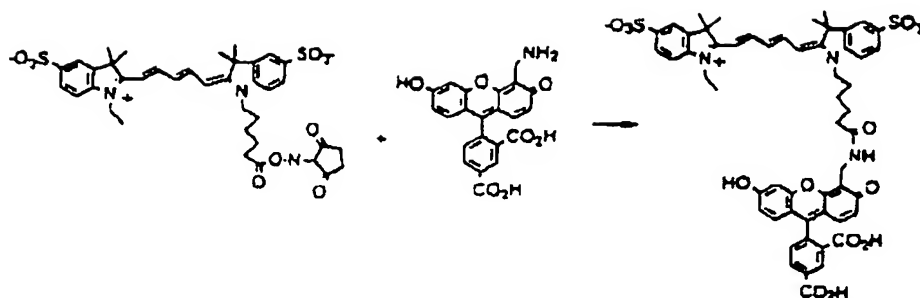
【0131】5ROX NHSの溶液(100 μ LのDMSO中2 μ モル)をCF(100 μ LのDMSO中2 μ モル)及びトリエチルアミン(10 μ L)と混合した。20%~40%のアセトニトリル対0.1MのTEAAの勾配溶離によりC8逆相カラムによるHPLCにより反応を追跡した。反応液を5%のHCl(1mL)中で希釈し、生成物を遠心分離により回収し、5%のHCl(1

x1mL)で洗浄し、真空遠心分離機中で乾燥させた。生成物をDMF(200 μ L)に吸収させた。

3. Cy5の合成

【0132】

【化72】



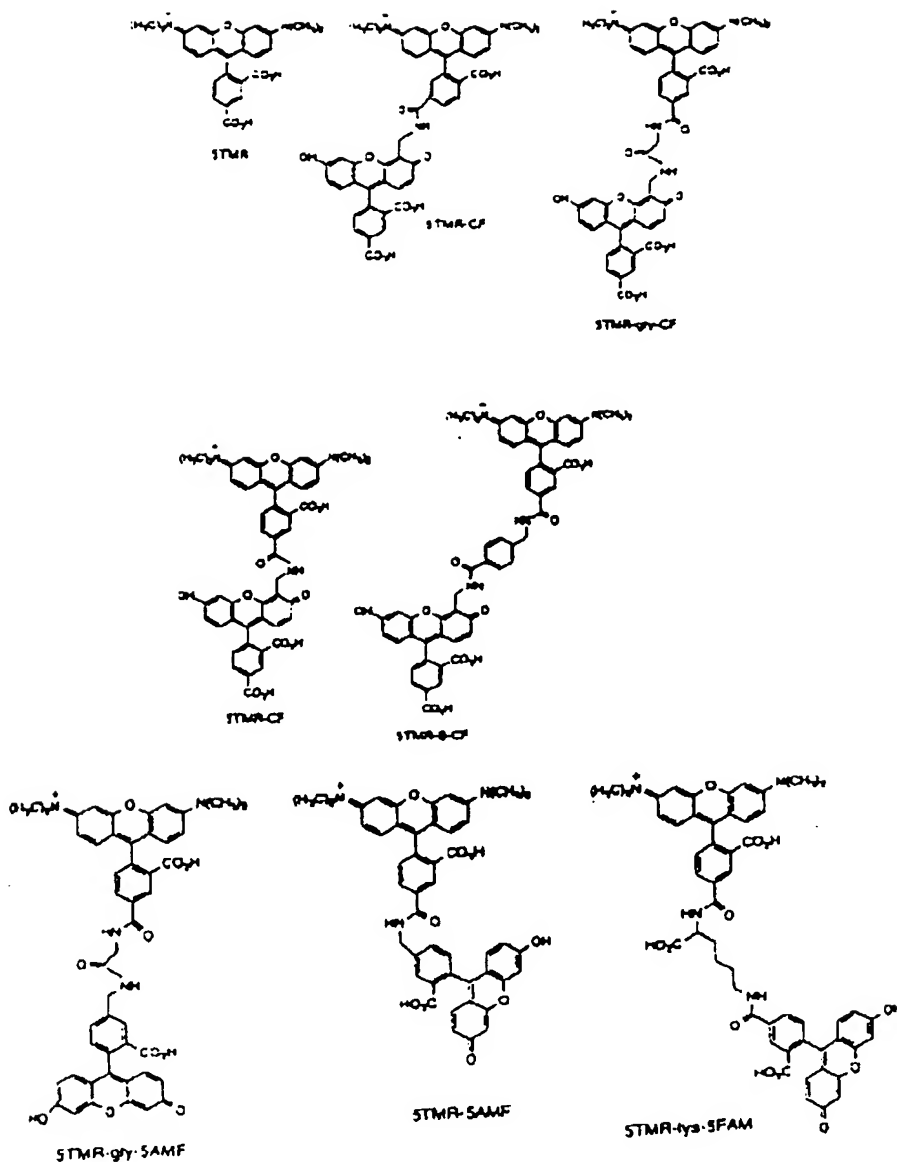
【0133】CFの溶液(20 μ L のCMSO中0.4 μ モル)及びトリエチルアミン(2 μ L)をモノCy5 NHS(約0.3 μ モル)に添加した。10%~30%のアセトニトリル対0.1MのTEAAの勾配溶離を使用してC8逆相カラムによるHPLCにより反応を追跡した。反応液を5%のHCl (1mL) 中で希釈し、生成物を遠心分離により回収し、5%のHCl (1x1mL) で洗浄し、真空遠心分離機中で乾燥させた。生成物をDMF(100 μ L)に吸収させた。

4. エネルギー転移色素の蛍光強さの比較

以下の実施例は本発明の一連のエネルギー転移色素の蛍光放出強さを比較する。5TMR、6TMR-CF、5TMR-gly-CF、5TMR-CF、5TMR-B-CF、5TMR-gly-5AMF、5TMR-5AMF及び5TMR-lys-5FAMの色素溶液を1xTBE/8M尿素中で測定した。夫々の色素溶液は560nmで0.1の光学密度を有し、488nmで励起された。

【0134】

【化73】



【0135】これらの色素の夫々の構造を表7に示す。図2はこれらの色素の夫々の相対蛍光の棒グラフを示す。図2からわかるように、リンカーが5環位でアクセプターに結合されているエネルギー転移色素(5TMR-CF及び5TMR-B-CF)は、アクセプター色素それ自体またはアクセプター色素が6環位で結合されている場合(6TMR-CF)よりもかなり強い蛍光を示すことがわかった。また、図2からわかるように、リンカーが式 $R_1-XC(O)R_2$ (式中、 R_2 はベンゼンである)を有するエネルギー転移色素(5TMR-B-CF)は、リンカーが式 $-CH_2NHCO-$ (5TMR-CF)または $-CH_2NHCOCH_2NHCO-$ (5TMR-gly-5AMF)を有する色素と比較してかなり増強された蛍光を有することがわかった。また、図2からわかるように、リンカーが5環位でドナー及びアクセプターの両方に結合されているエネルギー転移色素(5TMR-5AMF及び5TMR-gly-5AMF)はかなりの蛍光を有することがわかった。重要なことに、リシンリンカーの使用はドナーとアクセプターの間の認め

られるエネルギー転移をもたらさないことがわかった。

【0136】5. エネルギー転移色素を使用する色素プライマー配列決定

この実施例において、5TMR-CF 標識されたオリゴヌクレオチド及び5TMR-B-CF標識されたオリゴヌクレオチドの相対的明度を比較するために色素プライマー配列決定をM13(配列番号1)について行った。この実施例において、色素プライマー配列決定をABI PRISM 377 DNA Sequencer User's Manual, Rev.B, 1995年1月, 2章(p/n 402114, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA)に従って行った。5TMR-CF及び5TMR-B-CFの夫々をM13-21プライマー(配列番号2)の5'末端に結合した。夫々のプライマーの等モル溶液をM13(配列番号1)と混合し、単一ジデオキシヌクレオチド混合物(ddA/dNT P)及びTaq PSで配列決定した。5TMR-CF 標識されたプライマー及び5TMR-B-CF 標識されたプライマーを使用して検出されたオリゴヌクレオチドの得られる混合物のプロ

ットを図9に示す。図9からわかるように、5TMR-B-CFで標識されたオリゴヌクレオチドは5TMR-CFで標識されたオリゴヌクレオチドよりも明るい。また、図9からわかるように、5TMR-B-CFで標識されたオリゴヌクレオチドの移動度は5TMR-CFで標識されたオリゴヌクレオチドよりも約1ヌクレオチド遅かった。

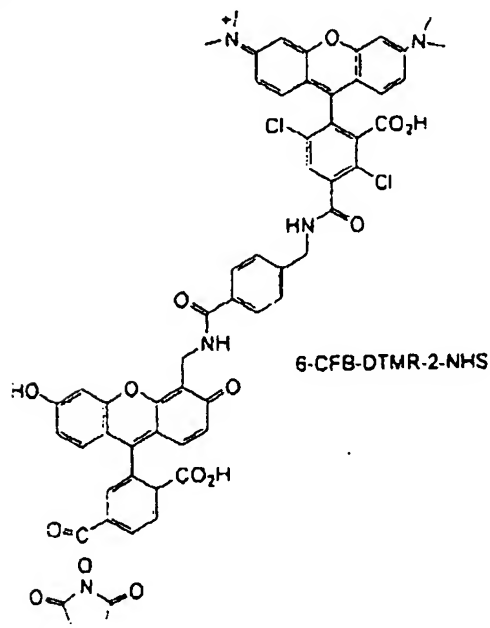
【0137】6. 4種の色素を使用する色素プライマー配列決定

実施例5に記載されたM13-21プライマー（配列番号2）に結合された4種の色素の組を使用して、色素プライマー配列決定をM13（配列番号1）について行った。図10は配列決定から生成された色素標識されたオリゴヌクレオチドの4色プロットである。シトシンに関するピークは5-カルボキシ-R110の蛍光に相当する。アデノシンに関するピークは5-カルボキシ-R6Gの蛍光に相当する。グアノシンに関するピークはTMR-B-CFの蛍光に相当する。チミジンに関するピークはROX-CFの蛍光に相当する。図10からわかるように、色素標識されたオリゴヌクレオチドの夫々がかなりの蛍光強さを示す。加えて、異なる色素標識されたオリゴヌクレオチドは、一連のピークの良い分解が得られる程に十分に同様の移動度を示す。

7. 6-CFB-DTMR-2-NHSの合成

【0138】

【化74】

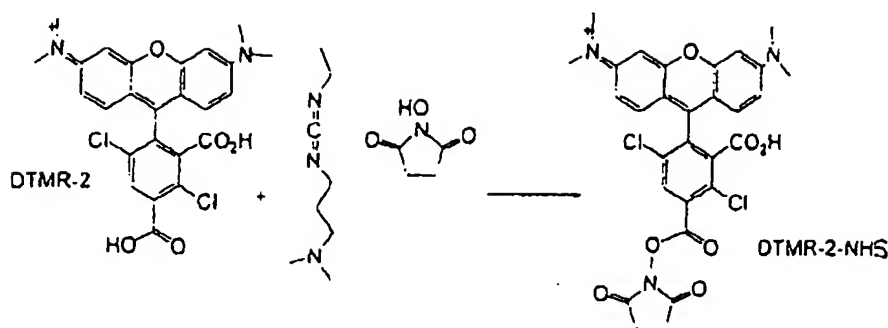


【0139】実施例1A-Bに記載された反応順序に従って6-CFB-DTMR-2をDTMR-2及び6-CFBから合成した。次いで6-CFB-DTMR-2を1Cに記載された反応順序に従って6-CFB-DTMR-2-NHSに変換し、その結果、色素をヌクレオシド、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマーにカップリングすることができた。

A. DTMR-2-NHSの合成

【0140】

【化75】



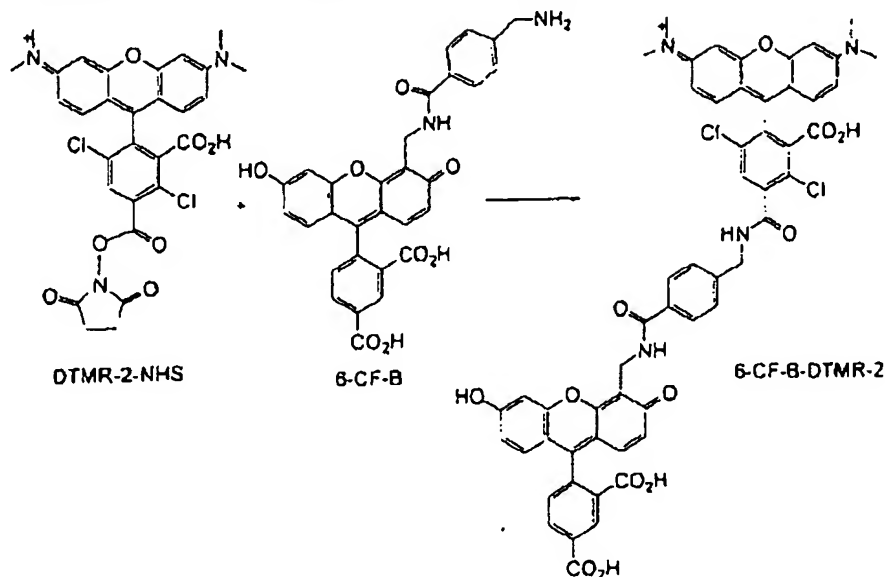
【0141】DMF中のDTMR-2の溶液、N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩をエッペンドルフ管中で合わせ、60℃に加熱した。反応の進行をシリカゲルによるTLCにより監視した。反応が完結したことが明らかになった後、その溶液を塩化メチレン中で希釈し、25

0 mMの炭酸塩/重炭酸塩緩衝液 (pH 9、4x1 mL) で洗浄し、次いでHCl 溶液 (5%、1x1 mL) で洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、真空遠心分離機で濃縮、乾燥させた。

B. 6-CF-B-DTMR-2 の合成

【0142】

【化76】



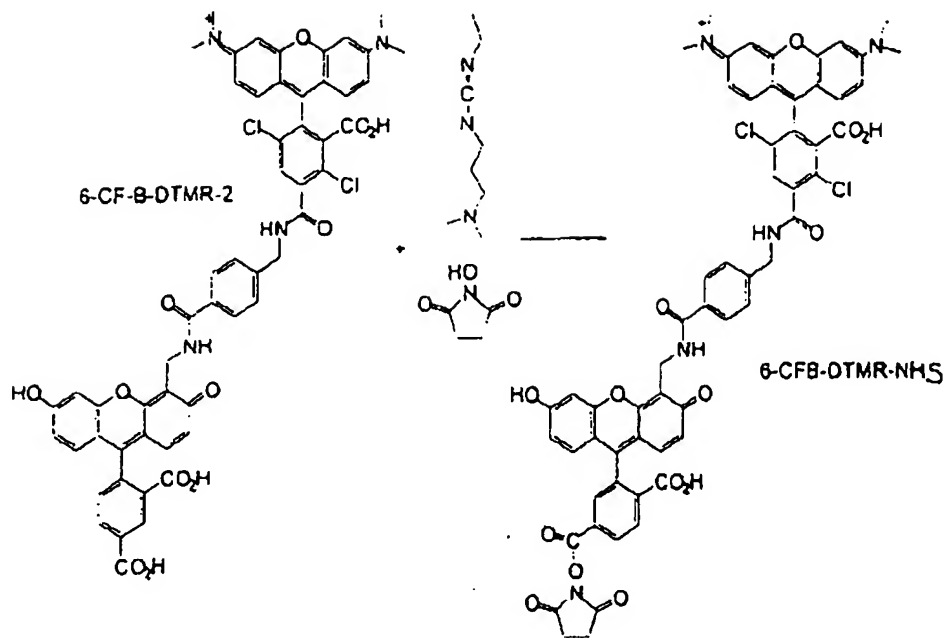
【0143】ジメチルスルホキシド中の6-CFB の溶液 (100 μL 、11mM) をジメチルホルムアミド中のDTMR-2 スクシドイミジルエステルの溶液 (100 μL 、22mM) 及びトリエチルアミン (20 μL) と合わせた。その反応液を塩酸 (5%、1 mL) の溶液に添加し、固体を遠心分離により分離した。赤色固体を炭酸塩/重炭酸塩緩衝液 (250 mM、pH 9、100 μL) に溶解し、希HCl で再度沈殿させた。固体を真空遠心分離機中で乾燥させ、ジメチルホルムアミド (200 μL) に溶解した。色素溶液の濃度を、アリ

コート を40%のアセトニトリル/0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液 (pH 7) 中で希釈することにより測定した。フルオレセインについて $80,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ の吸光率を仮定して、6-CF-B-DTMR-2 溶液は4 mM (収率70%) であることがわかった。

C. 6-CF-B-DTMR-NHS の合成

【0144】

【化77】



【0145】ジメチルホルムアミド中の6-CF-B-DTMR-2の溶液(200 μ L、4mM)にN-ヒドロキシスクシンイミド(10mg)及び1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(5 μ g)を添加した。追加のN-ヒドロキシスクシンイミド(10mg)を添加した。反応の進行を600:60:16の混合物中のジクロロメタン:メタノール:酢酸で溶離してシリカゲルによる薄層クロマトグラフィーにより監視した。反応が完結した時、希HCl(5%、1mL)を添加し、生成物を遠心分離により分離した。固体を真空遠心分離機中で乾燥させ、ジメチルホルムアミド(100 μ L)に溶解した。色素溶液の濃度を、アリコートに40%のアセトニトリル/0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液(pH7)中で希釈することにより測定した。フルオレセインについて80,000 $\text{cm}^{-1}\text{m}^{-1}$ の吸光率を仮定して、6-CF-B-DTMR-NHS溶液は5.4mM(収率68%)であることがわかった。

【0146】8. 色素の蛍光強さの比較

以下の実施例は相当するアクセプター色素に対する本発明の一連のエネルギー転移色素の蛍光放出強さを比較する。この実施例によれば、夫々の色素を5'末端でアミノヘキシル結合により21プライマー配列(5'-TGTAACGACGCCAGT)(配列番号1)に結合した。180,000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ の吸光率を仮定して、オリゴヌクレオチドを260nmにおける吸光度に基いて定量した。スペクトルを488nm励起により8M尿素、1Xトリス/ボレート/EDTA(TBE)緩衝液中0.4 μ Mのプライマー濃度で得た。図11Aは5-CFB-DR110-2及びDR110-2の重なったスペクトルを示す。図11Bは5-CFB-DR6G-2及びDR6G-2の重なったスペクトルを示す。図12Cは6-CFB-DTMR-2及びDTMR-2の重なったスペクトルを示す。図12Dは6-CFB-DROX-2及びDROX-2の重なったスペクトルを示す。これらの色素の構造を表1に示す。図11A～図12Dからわかるように、エネルギー転移

色素はアクセプター色素それ自体よりもかなり強い蛍光を示すことがわかった。図13は4種の色素標識されたオリゴヌクレオチドの基準化された蛍光放出スペクトルを示す。スペクトルを488nm励起により8M尿素、1Xトリス/ボレート/EDTA(TBE)緩衝液中0.4 μ Mのプライマー濃度で得た。図13に示された色素は5-CFB-DR110-2、5-CFB-DR6G-2、6-CFB-DTMR-2、及び6-CFB-DROX-2を含む。図13からわかるように、全ての4種のエネルギー転移色素は互いに対し良く分解される。

【0147】9. エネルギー転移色素を使用する色素プライマー配列決定

この実施例において、5-CF-TMR-2標識されたプライマー、5-CF-B-TMR-2標識されたプライマー、6-CF-B-DTMR-2標識されたプライマー及びDTMR-2標識されたプライマーを使用して、色素プライマー配列決定をM13(配列番号2)について行った。この実施例において、色素プライマー配列決定をABI PRISM™ 377 DNA Sequencer User's Manual, Rev.B, 1995年1月, 2章(p/n 402114, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA)に従って行った。色素をM13-21プライマー(配列番号3)の5'末端に結合した。夫々のプライマーの等モル溶液をM13(配列番号2)と混合し、単一デオキシヌクレオチド混合(ddA/dNTP)及びTaq FSで配列決定した。5-CF-TMR-2標識されたプライマー及び5-CF-B-TMR-2標識されたプライマーを使用して検出されたオリゴヌクレオチドの得られる混合物のプロットを図14に示す。この図からわかるように、5-CF-B-TMR-2は5-CF-TMR-2よりもかなり強いシグナルを示し、5-CF-B-TMR-2中に使用されたリンカーにより与えられた蛍光増強を示す。6-CF-B-DTMR-2標識されたプライマー及びDTMR-2標識されたプライマーを使用して検出されたオリゴヌクレオチドの得られる混合物のプロットを図15に示す。この図からわかるように、6-CF

-B-DTMR-2 はDTMR-2よりもかなり強いシグナルを示し、そのエネルギー転移色素により与えられた蛍光増強を示す。

【0148】10. 4種の色素を使用する色素プライマー配列決定

実施例5に記載されたM13-21プライマー（配列番号3）に結合された4種の色素の組を使用して、色素プライマー配列決定をM13（配列番号2）について行った。図16及び17は配列決定から生成された色素標識されたオリゴヌクレオチドの4色プロットである。シトシンに関するピークは5-CFB-DR110-2の蛍光に相当する。アデノシンに関するピークは6-CFB-DR6g-2の蛍光に相当する。グアノシンに関するピークは5-CFB-DTMR-2の蛍光に相当する。チミジンに関するピークは5-CFB-DROX-2の蛍光に相当する。図16及び17からわかるように、色素標識されたオリゴヌクレオチドの夫々がかなりの蛍光強さを示す。加え

て、異なる色素標識されたオリゴヌクレオチドは、一連のピークの良好な分解が得られる程に十分に同様の移動度を示す。本発明の好ましい実施態様の以上の記載は説明及び記載の目的で示された、排他的であること、または本発明を開示された正確な形態に限定することは意図されていない。明らかに、多くの改良及び変化が当業者に明らかであり、本発明の範囲内に入ることが意図されている。

【配列表】

【0149】(2) 配列番号：1の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1217ヌクレオチド

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号：1

GCCAAGCTTG	CATGCCTGCA	GGTCGACTCT	AGAGGATCCC	40
CGGGTACCGA	GCTCGAATTC	CTAATCATGG	TCATAGCTGT	80
TTCTGTGTG	AAATTGTTAT	CCGCTCACA	TTCCACACAA	120
CATACGAGCC	GGAAGCATAA	AGTGTAAGC	CTGGGGTGCC	160
TAATGAGTGA	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	200
TGCCCGCTTT	CCAGTCGGGA	AACCTGTCGT	GCCAGCTGCA	240
TTAATGAATC	GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG	CGTTTTCGT	280
ATTGGGCGCC	AGGGTGGTTT	TTCTTTTCAC	CAGTGAGACG	320
GGCAACAGCT	GATTGCCCTT	CACCGCCTGG	CCCTGAGAGA	360
GTTGCAGCAA	GCGGTCCACG	CTGGTTTGCC	CCAGCAGGCG	400
AAAATCCTGT	TTGATGGTGG	TTCCGAAATC	GGCAAAATCC	440
CTTATAAATC	AAAAGAATAG	CCCAGATAG	GGTTGAGTGT	480
TGTTCCAGTT	TGGAACAAGA	GTCCACTATT	AAAGAACGTG	520
GACTCCAACG	TCAAAGGGCG	AAAAACCGTC	TATCAGGGCG	560
ATGGCCCACT	ACGTGAACCA	TCACCCAAAT	CAAGTTTTTT	600
GGGGTCGAGG	TGCCGTAAG	CACTAAATCG	GAACCCTAAA	640
GGGAGCCCC	GATTTAGAGC	TTGACGGGGA	AAGCCGGCGA	680
ACGTGGCGAG	AAAGGAAGGG	AAGAAAGCGA	AAGGAGCGGG	720
CGCTAGGGCG	CTGGCAAGTG	TAGCGGTAC	GCTGCGCGTA	760
ACCACCACAC	CCGCCGCGCT	TAATGCGCCG	CTACAGGGCG	800
CGTACTATGG	TTGCTTTGAC	GAGCACTAT	AACGTGCTTT	840
CCTCGTTGGA	ATCAGAGCGG	GAGCTAACA	GGAGGCCGAT	880
TAAAGGGATT	TTAGACAGGA	ACGGTACGCC	AGAATCTTGA	920
GAAGTGTTTT	TATAATCAGT	GAGGCCACCG	AGTAAAGAG	960
TCTGTCCATC	ACGCAAATTA	ACCGTTGTAG	CAATACTTCT	1000
TTGATTAGTA	ATAACATCAC	TTGCCGTAGT	AGAAGAACTC	1040
AAACTATCGG	CCTTGCTGGT	AATATCCAGA	ACAATATTAC	1080
CGCCAGCCAT	TGCAACAGGA	AAACGCTCA	TGGAAATACC	1120
TACATTTTGA	CGCTCAATCG	TCTGAAATGG	ATTATTTACA	1160
TTGGCAGATT	CACCAGTCAC	ACGACCAGTA	ATAAAAGGGA	1200
CATTCTGGCC	AACAGAG			1217

【0150】(2) 配列番号：2の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：18ヌクレオチド

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号：2

TGTAACGA CGGCCAGT

18

【図面の簡単な説明】

【図1】活性化されたN-ヒドロキシスクシンイミジル(NHS)エステル(これは次いでアミノヘキシルオリゴマーと反応させられて色素標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを生成する)へのエネルギー転移色素のカルボキシ置換基の修飾を示す。

【図2】本発明の一連のエネルギー転移色素の蛍光放出強さをその他のエネルギー転移色素及びアクセター色素単独と比較する。

【図3】本発明のエネルギー転移色素中に使用し得る4,7-ジクロロローダミン色素化合物の幾つかの特に好ましい実施態様を示す。

【図4】本発明のエネルギー転移色素中に使用し得る4,7-ジクロロローダミン色素化合物の幾つかの特に好ましい実施態様を示す。

【図5】本発明の4,7-ジクロロローダミン色素(置換基 X_1 がカルボキシレート以外であり得る)の調製の好ましい一般化された合成スキームを示す。

【図6】本発明の4,7-ジクロロローダミン色素(置換基 X_1 がカルボキシレートである)の調製の好ましい一般化された合成スキームを示す。

【図7】互いにスペクトル的に分解可能である4種の色素(3-カルボキシ-R110、5-カルボキシ-R6G、5TMR-B-CF及び5ROX-CF)の組を示す。

【図8】互いにスペクトル的に分解可能である4種の色素(3-カルボキシ-R110、5-カルボキシ-R6G、5ROX-CF及びCy5-CF)の組を示す。

【図9】5TMR-CF 標識されたプライマー及び5TMR-B-CF

標識されたプライマーを使用する色素プライマー配列決定中に生成された標識されたオリゴヌクレオチドの混合物のプロットである。

【図10】3-カルボキシ-R110、5-カルボキシ-R6G、5TMR-CF及び5TMR-B-CFを含む4色素の組を使用する色素プライマー配列決定の4色プロットである。

【図11】6-CFB-DR110-2及びDR110-2の重なったスペクトル並びに5-CFB-DR6G-2及びDR6G-2の重なったスペクトルを示す。

【図12】6-CFB-DTMR-2及びDTMR-2の重なったスペクトル並びに6-CFB-DROX-2及びDROX-2の重なったスペクトルを示す。

【図13】互いにスペクトル的に分解可能である4種の色素(5-CFB-DR110-2、5CFB-DR6G-2、6-CFB-DTMR-2、及び6-CFB-DROX-2)の組を示す。

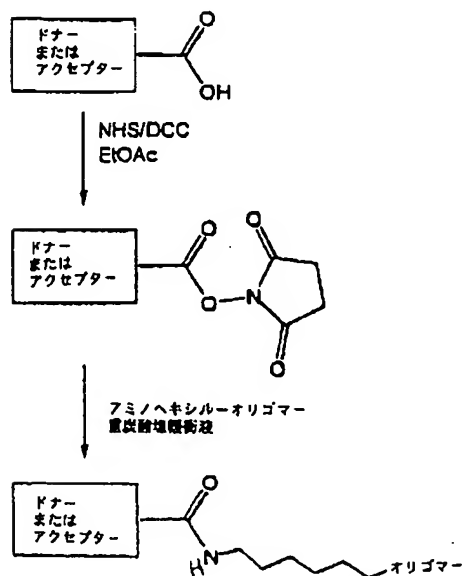
【図14】6-CFB-DTMR-2標識されたプライマー及びDTMR-2標識されたプライマーを使用する色素プライマー配列決定中に生成された標識されたオリゴヌクレオチドの混合物のプロットである。

【図15】5-CF-TMR-2標識されたプライマー及び5-CF-B-TMR-2標識されたプライマーを使用する色素プライマー配列決定中に生成された標識されたオリゴヌクレオチドの混合物のプロットである。

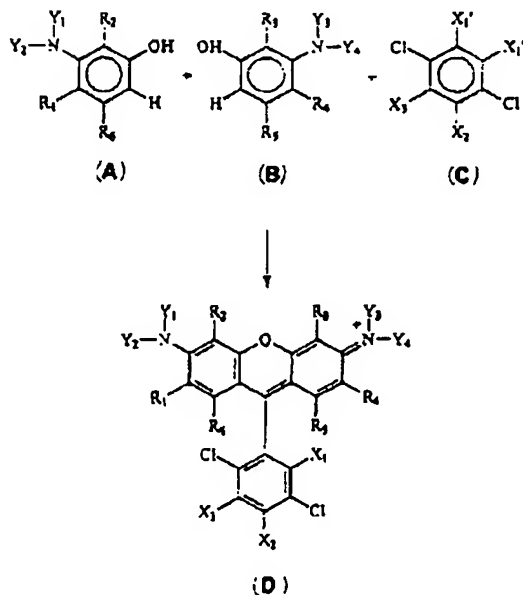
【図16】5-CFB-DR110-2、6-CFB-DR6g-2、5-CFB-DTMR-2、及び5-CFB-DROX-2を含む4種の色素の組を使用する色素プライマー配列決定の4色プロットである。

【図17】5-CFB-DR110-2、6-CFB-DR6g-2、5-CFB-DTMR-2、及び5-CFB-DROX-2を含む4種の色素の組を使用する色素プライマー配列決定の4色プロットである。

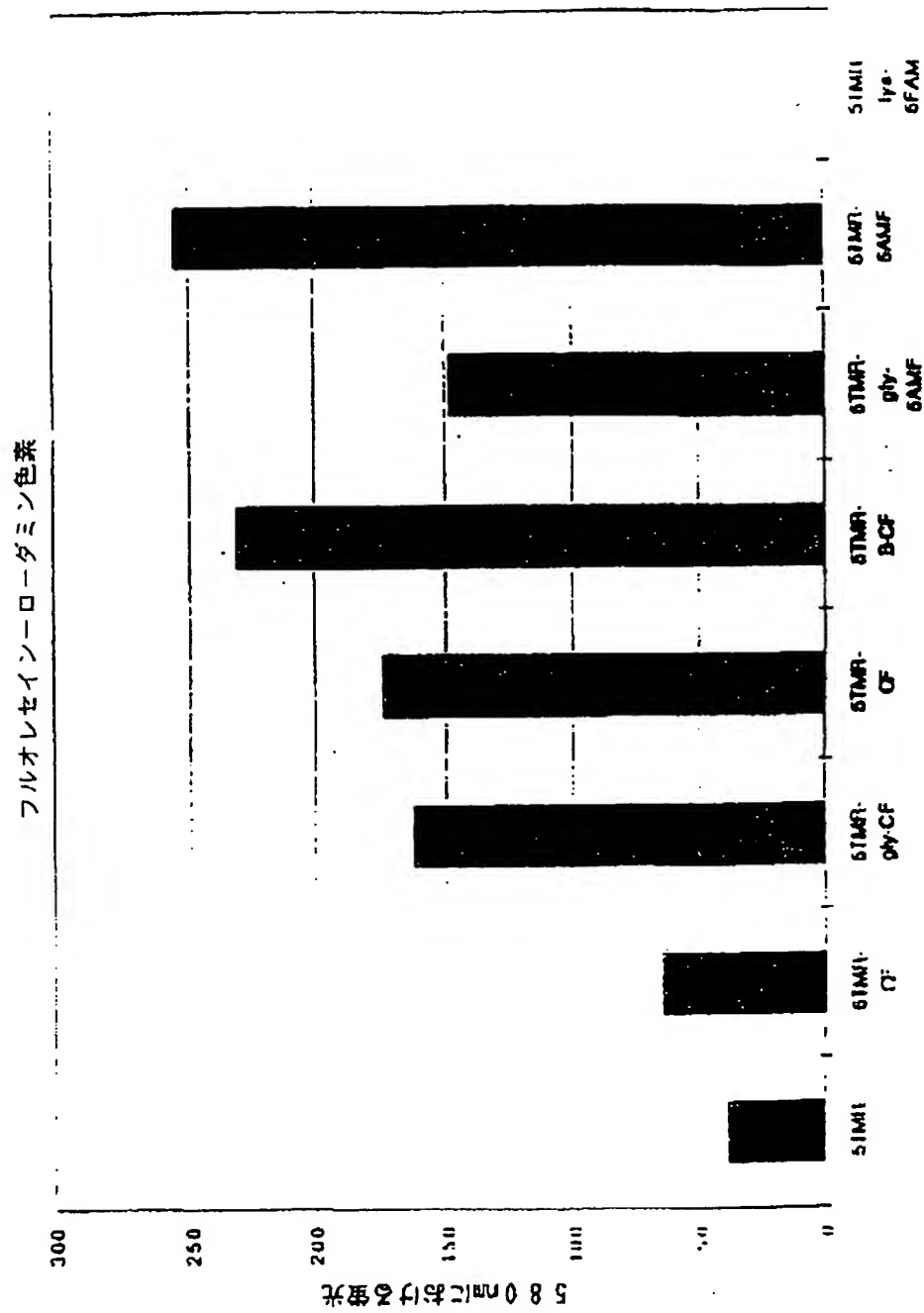
【図1】



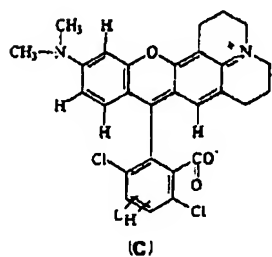
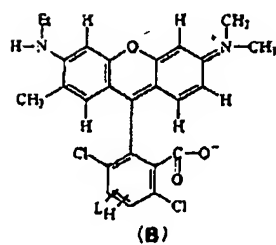
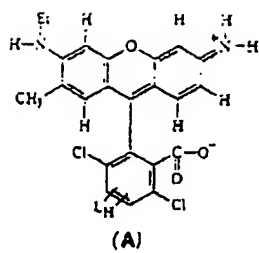
【図5】



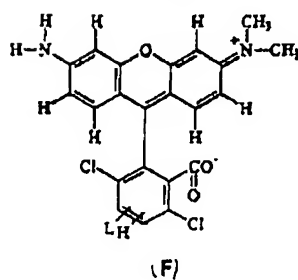
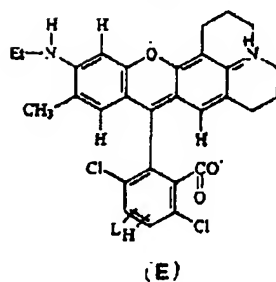
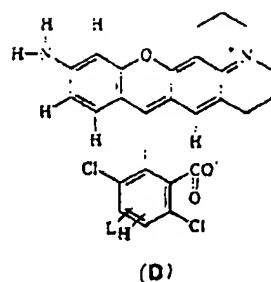
【図2】



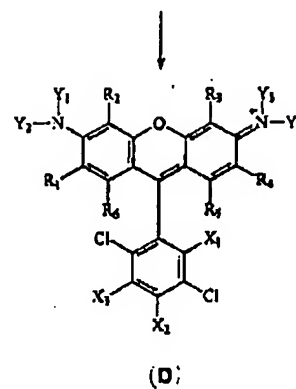
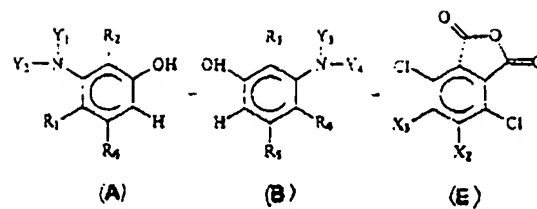
【図3】



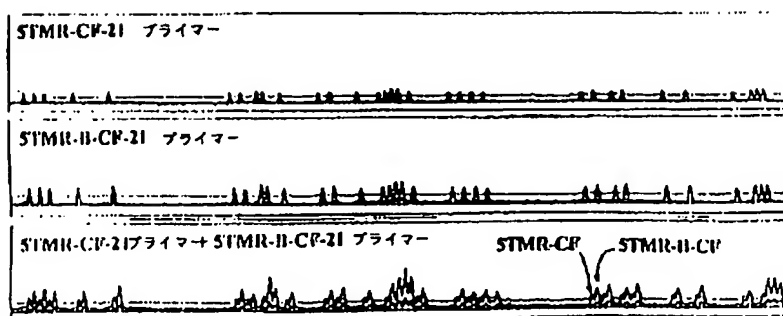
【図4】



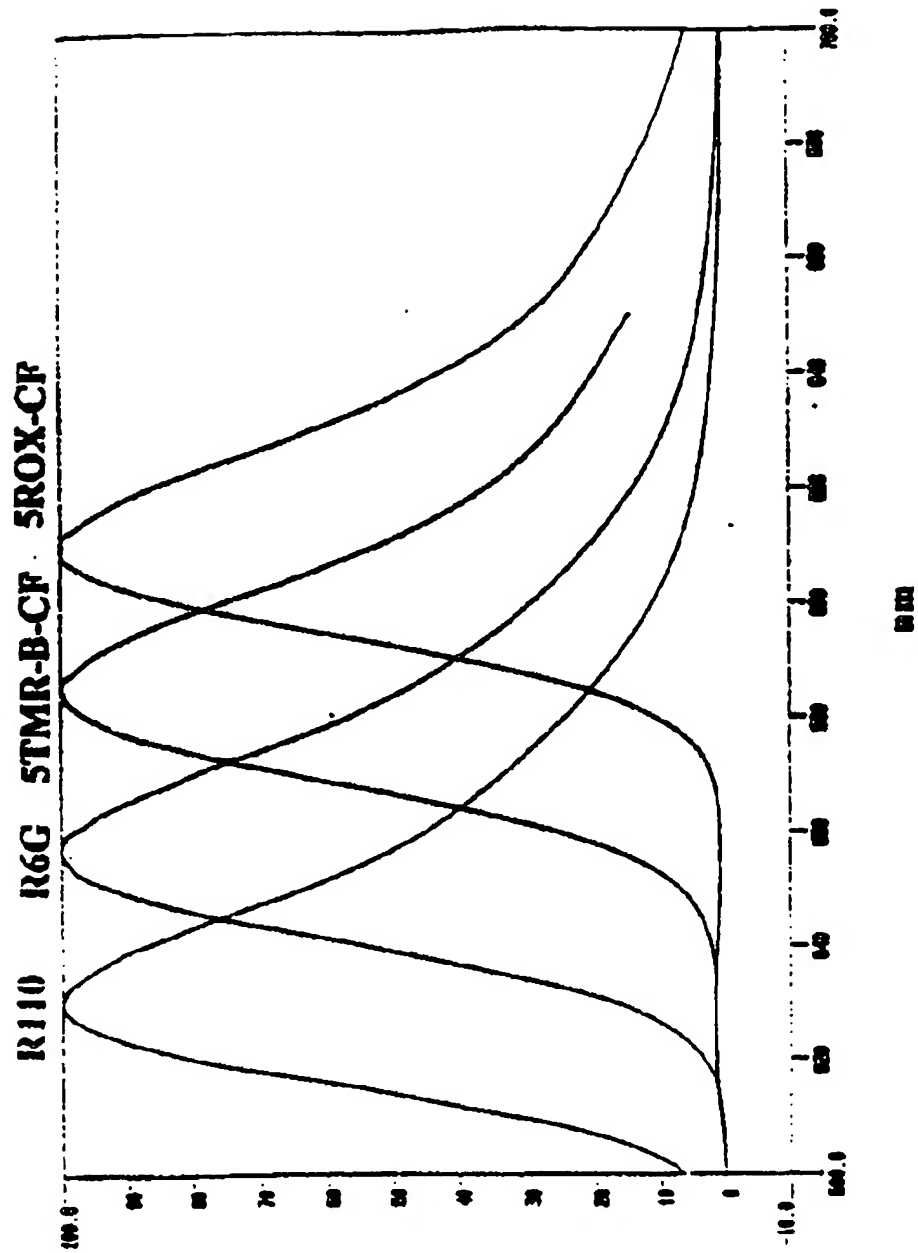
【図6】



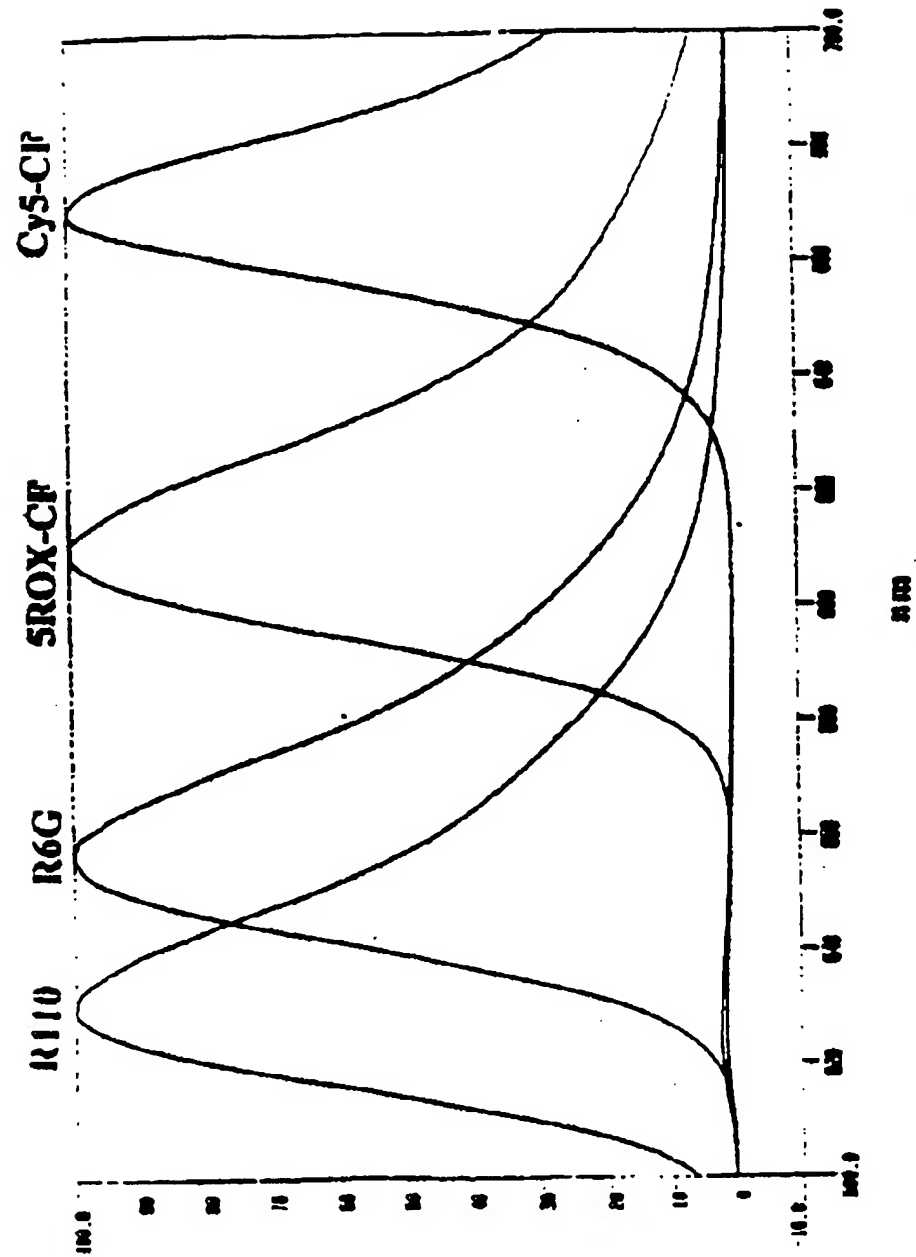
【図9】



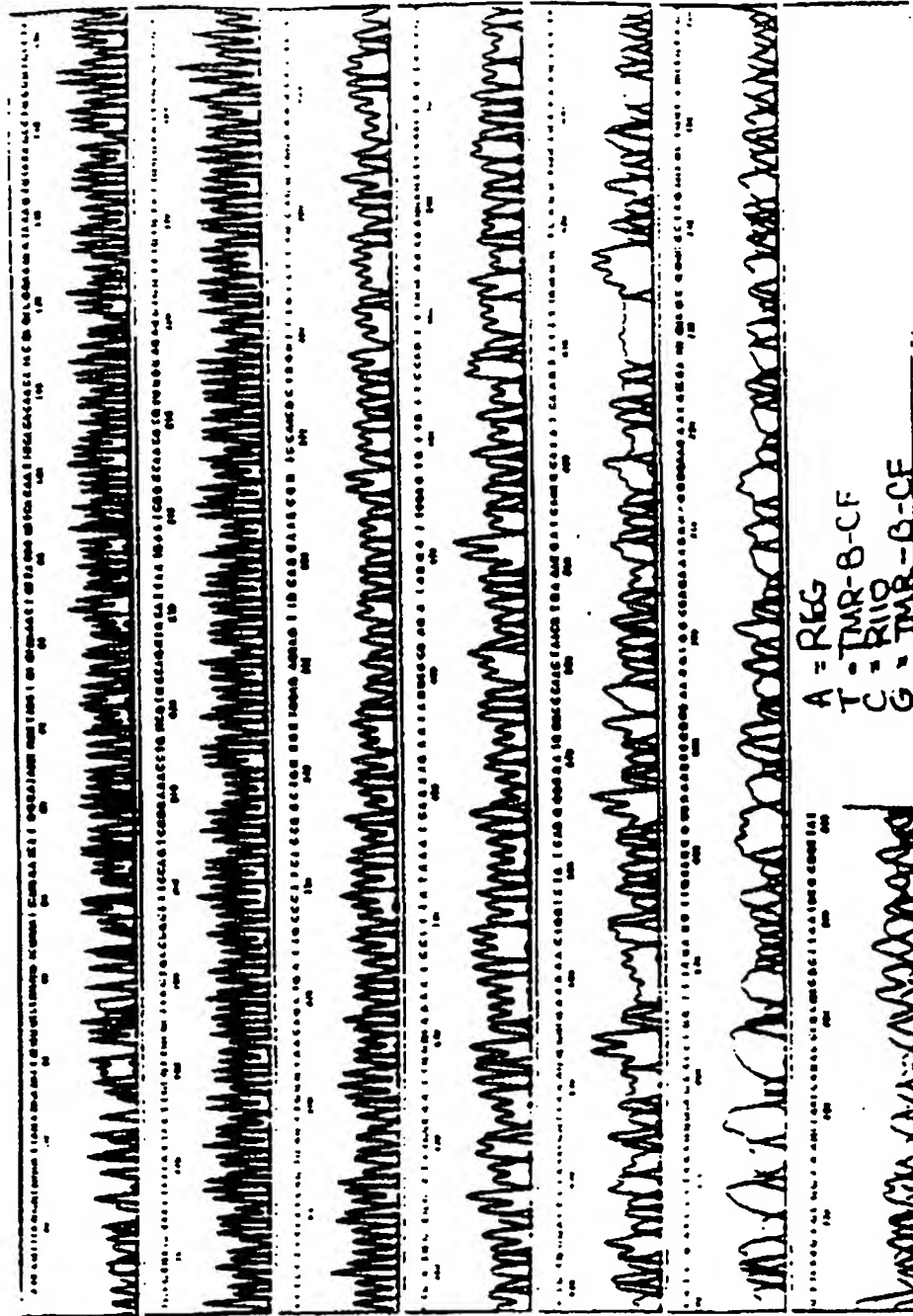
【図7】



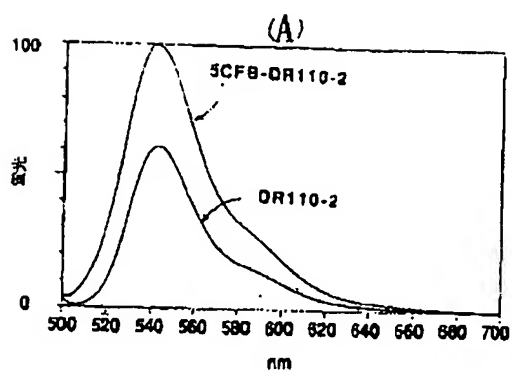
【図8】



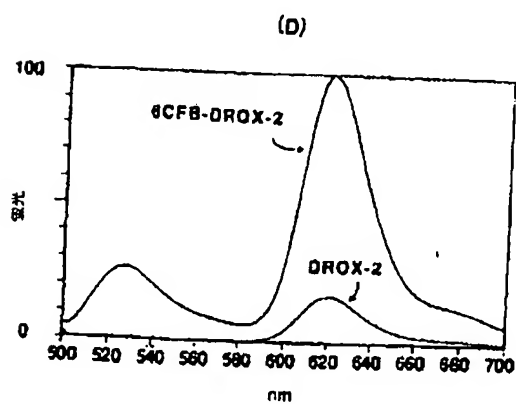
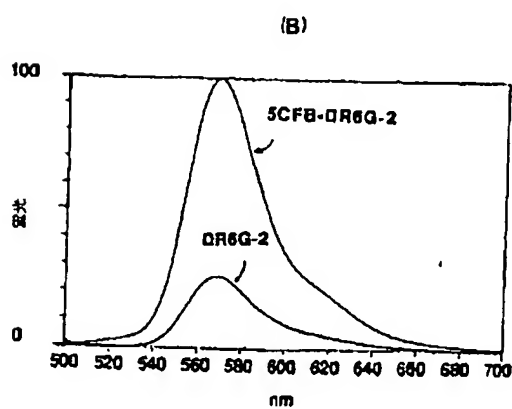
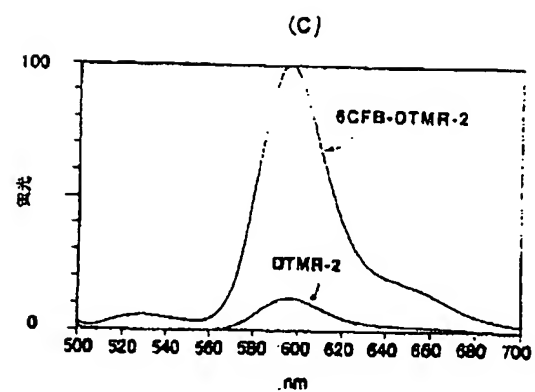
【図10】



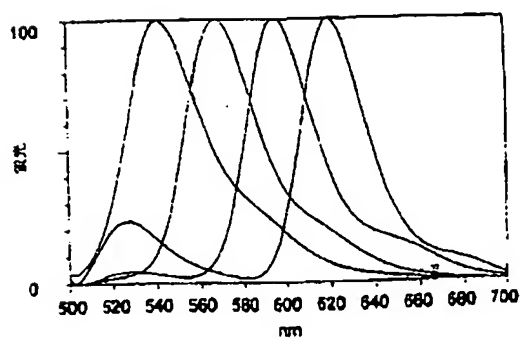
【図11】



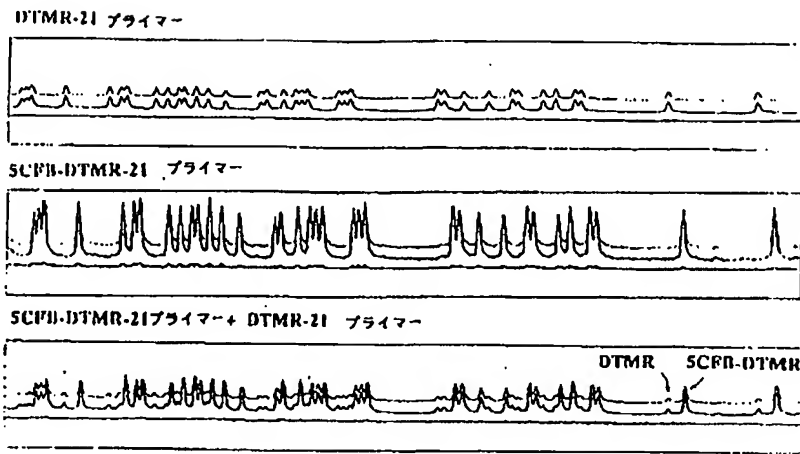
【図12】



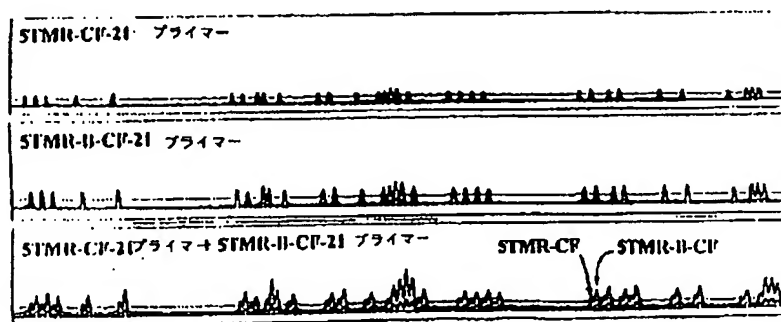
【図13】



【図14】

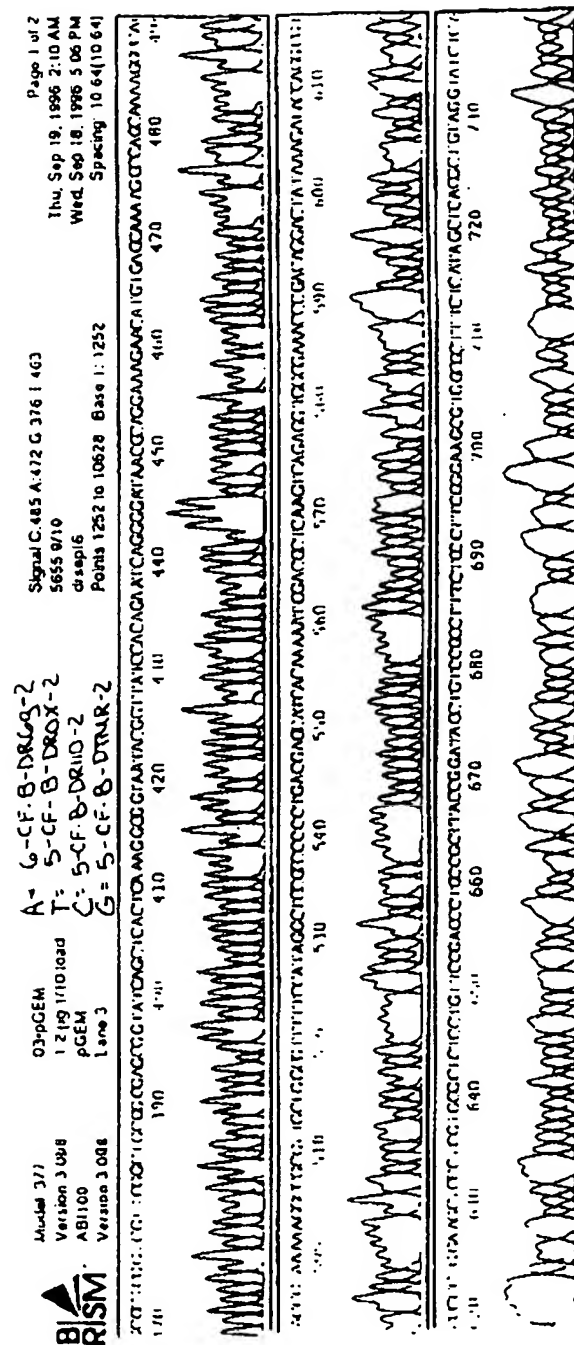


【図15】



[illegible]

【図17】



フロントページの続き

(72)発明者 サンドラ エル スパージョン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州
 94403 サン マテオ ロス ブラドス
 ストリート 3361

(72)発明者 バーネット ローゼンブルーム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州
 95118 サン ホセ エステール アベニ
 ュー 1521